

Aus der Klinik für Vögel der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Univ.-Prof. Dr. R. T. Korbelt

Arbeit angefertigt unter Leitung von Priv.-Doz. Dr. C. H. Grund

**Entwicklung serologischer Nachweisverfahren einer  
Taubencircovirusinfektion auf der Basis eines  
rekombinanten Kapsidproteinantigens**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von  
Iris Daum  
aus München

München 2009

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Grund

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Sutter

Tag der Promotion: 17. Juli 2009

Meinen Eltern

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Literaturübersicht.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Circoviridae .....</b>	<b>3</b>
<b>2.2 Gyrovirus .....</b>	<b>4</b>
2.2.1 Morphologie .....	4
2.2.2 Genomorganisation und Virusreplikation .....	5
2.2.3 Krankheitsbild .....	6
<b>2.3 Circovirus .....</b>	<b>7</b>
2.3.1 Morphologie .....	9
2.3.2 Genomorganisation und Virusreplikation .....	10
2.3.3 Krankheitsbild .....	13
<b>2.4 Das Pigeon-Circovirus.....</b>	<b>14</b>
2.4.1 Morphologie .....	14
2.4.2 Genomorganisation und Virusreplikation .....	14
2.4.3 Verbreitung .....	19
2.4.4 Krankheitsbild .....	20
2.4.4.1 Haustauben .....	20
2.4.4.2 Palmtauben.....	22
2.4.5 Prävalenz.....	23
2.4.6 Nachweis .....	24
2.4.7 Pathogenese.....	26
2.4.8 Übertragung .....	28
2.4.9 Die Jungtaubenkrankheit .....	29

---

<b>3</b>	<b>Publikation .....</b>	<b>32</b>
3.1	Abstract .....	33
3.2	Introduction .....	34
3.3	Material and Methods .....	37
3.4	Results .....	44
3.5	Discussion .....	48
3.6	References.....	51
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>56</b>
4.1	Auswahl, Expression und Reinigung des Kapsidproteins von PiCV (rCapPiCV) .....	56
4.2	PiCV-Infektionsexperiment .....	58
4.3	Antigenizität und Spezifität .....	59
4.4	Indirekter ELISA zum Nachweis von anti-PiCV- Serumantikörpern: Entwicklung .....	61
4.5	Indirekter ELISA zum Nachweis von anti-PiCV- Serumantikörpern: Anwendung.....	62
4.5.1	Serokonversion .....	62
4.5.2	Korrelation zwischen Immunantwort und Verlauf einer PiCV-Infektion .....	63
4.5.3	Untersuchung von Seren natürlich infizierter Tauben auf anti-PiCV-Antikörper .....	64
4.5.4	Untersuchung von Feldseren auf anti-PiCV-Antikörper .....	66
4.6	Ausblick .....	68
4.6.1	Anti-PiCV-Antikörpernachweis .....	69
4.6.2	rCapPiCV .....	71

<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>72</b>
<b>6</b>	<b>Summary .....</b>	<b>74</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>76</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>91</b>

## Abkürzungsverzeichnis

aa	Aminosäuren
BFDV	Beak-and-Feather-Disease-Virus
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaCV	Canary-Circovirus
CAV	Chicken-Anemia-Virus
Cap	Kapsidprotein
CIA	Infektiöse Anämie der Küken (chicken infectious anemia)
CoCV	Columbid Circovirus, andere Bezeichnung für PiCV
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribinucleic acid)
DBH	Dot-blot-Hybridisierung
ds	(DNA) Doppelstrang
DuCV	Duck-Circovirus
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
<i>et al.</i>	und andere ( <i>et alii</i> )
FiCV	Finch-Circovirus
GaHV-2	Gallid Herpesvirus 2
GoCV	Goose-Circovirus
GuCV	Gull-Circovirus
HAH-Test	Hämagglutinations-Hemmungs-Test
IBDV	Gumborovirus (infectious bursal disease virus)
IgM	Immunglobulin M
IgY	Immunglobulin Y
ISH	<i>in-situ</i> -Hybridisierung
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
mRNA	messenger RNA
NDV	Newcastle-Disease-Virus
nt	Nukleotide

---

ORF	Leserahmen (open reading frame)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PCV	Porcines Circovirus
PCV-1	Porcines Circovirus Typ 1
PCV-2	Porcines Circovirus Typ 2
PCVD	porcine circovirus diseases
p. i.	post inoculationem
PiCV	Pigeon-Circovirus
PMWS	postweaning multisystemic wasting syndrom
RaCV	Raven-Circovirus
RCR	rolling circle replication
Rep	mit der Replikation assoziiertes Protein
Rep'	gespleißte Form des Rep
RF	Replikationsform
SDS-PAGE	Sodeumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SPF	spezifiziert pathogenfrei
ss	(DNA) Einzelstrang (single strand)
StCV	Starling-Circovirus
SwCV	Swan-Circovirus
tRNA	transfer RNA
VP	Virusprotein
z. B.	zum Beispiel

Aminosäure- und Nukleotidabkürzungen nach den Richtlinien der International Union of Biochemistry

Virusspeziesabkürzungen nach den Vorgaben des International Committee on Taxonomy of Viruses



# 1 Einleitung

In Deutschland zählen Tauben (*Columba livia* forma *domestica*) zu den beliebtesten Heimtieren. Schätzungen zufolge werden elf Millionen Tauben in privater Hand gehalten, davon circa (ca.) sechs Millionen Brieftauben sowie fünf Millionen Rassetauben. Da sich diese Zahlen auf ständig gehaltene Elterntiere beziehen, müssen noch einmal je zwei Jungtiere aus ein bis zwei (Brieftauben) beziehungsweise (bzw.) zwei bis drei (Rassetauben) Bruten pro Jahr und damit weitere 12 bis 15 Millionen Tauben hinzugerechnet werden. Damit werden weit mehr Tauben als Hunde und Katzen gehalten (Korbel *et al.*, 2009).

Ein Erreger, der seit seiner Identifizierung in den 90er Jahren des letzten Jahrhunderts mit zunehmender Häufigkeit aus Tauben isoliert wird und weltweit verbreitet ist, ist das Taubencircovirus oder Pigeon-Circovirus (PiCV). Es wird in Tauben jeder Nutzungsrichtung und jeden Alters nachgewiesen und es muss, auch wenn es bisher keine aussagekräftigen Studien zur Prävalenz gibt, von einem hohen Durchseuchungsgrad der Taubenpopulationen ausgegangen werden. PiCV wird eine entscheidende Rolle bei der Entstehung eines verlustreichen Symptomkomplexes, der Jungtaubenkrankheit oder young pigeon disease syndrom zugemessen (Raue *et al.*, 2005). Neben der klinisch manifesten Form der Infektion gibt es auch einen hohen Anteil subklinisch und/oder persistent infizierter Tiere. Durch den engen Kontakt der Tiere untereinander, insbesondere während der Reisesaison und bei Ausstellungen, spielen unerkannte Virusträger eine entscheidende Rolle bei der Ausbreitung von PiCV über Bestands- und Ländergrenzen hinweg.

Trotz seiner weiten Verbreitung ist die Pathogenese des Pigeon-Circovirus noch nicht geklärt. Welche Faktoren für die klinische Manifestation einer PiCV-Infektion verantwortlich sind, ist bis heute nicht bekannt.

Die Methoden zum Nachweis einer PiCV-Infektion beschränken sich bislang auf direkte Erregernachweise, zum Beispiel (z. B.) durch Elektronenmikroskopie oder

Polymerasekettenreaktion (PCR). Diese Methoden haben den Nachteil, dass eine sichere Diagnose nur durch die Untersuchung innerer Organe, also am toten Tier, gestellt werden kann. Der direkte Erregernachweis am lebenden Tier ist nur bei positivem Befund aussagekräftig und keine geeignete Methode, um nicht-virämische und subklinisch infizierte Tauben zu identifizieren.

Zur Ergänzung der direkten Virusnachweisverfahren für PiCV-Infektionen bieten sich deshalb indirekte Nachweisverfahren an, mit deren Hilfe Antikörper gegen PiCV im Blut nachgewiesen werden können. Diese Methoden haben den Vorteil, dass erstens der Nachweis von Antikörpern auch bei fehlendem direkten Erregernachweis als Indikator für eine PiCV-Infektion dienen kann, und dass zweitens die Gewinnung von Blutproben am lebenden Tier wenig invasiv möglich ist. Durch den Einsatz eines enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) zum Nachweis von Serumantikörpern kann die Probenbearbeitung und -auswertung automatisiert und objektiviert werden. Er stellt ein kostengünstiges, wenig zeitintensives Verfahren dar, das einen hohen Probendurchsatz ermöglicht.

Ziel dieser Arbeit war es daher – ergänzend zur molekularbiologischen Diagnostik – immunologische Testsysteme für den Nachweis von PiCV-Infektionen bei Tauben zu entwickeln.

Der entwickelte ELISA soll Untersuchungen zur Seroprävalenz von PiCV in unterschiedlichen Taubenpopulationen ermöglichen und helfen, mehr über die Epidemiologie, Pathogenese und Relevanz der PiCV-Infektion zu erfahren.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Circoviridae

Die taxonomische Klassifizierung von Viren durch das International Committee on Taxonomy of Viruses erfolgt anhand der Art und Form des Genoms, der Symmetrieform des Kapsids, dem Vorhandensein einer Membranhülle, der Anordnung der Gene innerhalb des Genoms, der Größe von Virion und Kapsid sowie der Replikationsstrategie, die vom Virus verfolgt wird. Für die Eingruppierung von Viren sind weiterhin medizinische oder epidemiologische Merkmale sowie Wirtsorganismen und Übertragungswege wichtige Kriterien. Bisher wurden mit den *Geminiviridae*, den *Nanoviridae* und den *Circoviridae* drei Familien unbehüllter Viren mit einzelsträngigem (ss) Desoxyribonukleinsäure- (DNA) Genom klassifiziert. Es bestehen Ähnlichkeiten mit den Mitgliedern des Genus *Anellovirus*. Aufgrund der abweichenden Transkriptionsstrategie und geringen Sequenzhomologie wird dieses Genus momentan keiner Virusfamilie zugeordnet (McNulty *et al.*, 2000).

Der Name *Circoviridae* leitet sich vom englischen circular und covalently closed ab und bezieht sich auf die ringförmige, kovalent geschlossene ssDNA dieser Virusfamilie. Unterschiede in Genomorganisation und Kapsidmorphologie führten dazu, dass die Familie *Circoviridae* seit dem International Congress of Virology 1999 in Sydney in zwei Genera klassifiziert ist: *Gyrovirus* und *Circovirus* (Pringle, 1999).

Die Viren der Familie *Circoviridae* sind unbehüllt und von ikosaedrischer Symmetrie. Bei Porcinem Circovirus Typ 2 (PCV-2), Chicken-Anemia-Virus (CAV) und Beak-and-Feather-Disease-Virus (BFDV) wird das Viruskapsid aus je 60 Proteinuntereinheiten gebildet, das heißt, es entstehen Ikosaeder mit der Triangulationszahl  $T = 1$  (Crowther *et al.*, 2003).

Ein weiteres besonderes Merkmal der Vertreter der Familie *Circoviridae* ist ihre sehr hohe Tenazität: Für die Mitglieder der Virusfamilie, CAV und Porcinem

Circovirus Typ 1 (PCV-1) wurde eine Säurebeständigkeit bis zu einem pH-Wert < 3 (Allan *et al.*, 1994) und für PCV-2 und CAV eine nahezu vollständige Resistenz gegen Heißluftsterilisation bis 120° C für 30 Minuten ermittelt (Welch *et al.*, 2006). Dadurch werden sie durch viele der üblichen Desinfektionsmaßnahmen nicht inaktiviert und persistieren so leichter als andere Viren in Beständen.

Aufgrund ihrer geringen Genomgröße von um die 2 Kilobasen (kb) und der damit verbundenen limitierten Kapazität zur Kodierung sind *Circoviridae* ein Paradigma für die Reduzierung der molekularen Ausstattung auf das Wesentliche. Ihre Vermehrung ist von den während der S-Phase des Zellzyklus zur Verfügung gestellten DNA-Replikationsmechanismen der Wirtszelle abhängig (Todd *et al.*, 2005).

## **2.2 Gyrovirus**

Das Genus *Gyrovirus* besteht aus einer einzigen Spezies, dem CAV (Yuasa *et al.*, 1979) (Pringle, 1999).

Obwohl das Haushuhn (*Gallus gallus domesticus*) der Hauptwirt von CAV ist, lässt der Nachweis von virusspezifischen Antikörpern eine Empfänglichkeit von Japanischen Wachteln (*Coturnix coturnix japonica*) vermuten (Farkas *et al.*, 1998).

### **2.2.1 Morphologie**

Vergleichende Untersuchungen zeigen, dass CAV-Partikel ca. 30 % größer sind als PCV-1 und BFDV (Todd *et al.*, 1991). Sie haben Durchmesser zwischen 19,1 und 26,5 nm.

In elektronenmikroskopischen Präparationen zeigen Gyroviren eine charakteristische Oberflächenstruktur mit peripheren Ausstülpungen, die dem Virus ein zahnradähnliches Aussehen verleihen (McNulty, 1991). In der dreidimensionalen Darstellung besitzt das Kapsid zwölf fünfeckige, trompetenförmige Kapsomere (Crowther *et al.*, 2003).

### 2.2.2 Genomorganisation und Virusreplikation

Im Unterschied zu Vertretern des Genus *Circovirus* ist das CAV-Genom negativ organisiert und besitzt drei sich teilweise überlappende Leserahmen (ORF) in 5' – 3' Richtung auf dem Virusstrang (Noteborn *et al.*, 1991). Das Gesamtgenom hat eine Größe zwischen 2298 und 2319 Nukleotiden (nt) (Claessens *et al.*, 1991; Noteborn *et al.*, 1991).

ORF 1 kodiert das einzige Strukturprotein, das Kapsidprotein, mit einer Masse von 45 Kilodalton (kDa) (Cap oder viral protein [VP] 1). ORF 2 kodiert eine Proteinphosphatase (VP 2, 30 kDa) und ORF 3 kodiert ein Protein, das die Apoptose der Wirtszelle initiiert (Apoptin oder VP 3, 16 kDa) (Chandratilleke *et al.*, 1991; Todd *et al.*, 2005).

Bei der Replikation wird eine polycistronische messenger Ribonukleinsäure (mRNA) von ca. 2 kb gebildet, die alle drei viralen Proteine kodiert (Noteborn *et al.*, 1992). Unklar ist bisher, wie die Proteinexpression einzelner Proteine von einer einzigen mRNA reguliert wird. Eine mögliche Erklärung dafür fanden Kamada *et al.* (2006): In CAV-infizierten MDCC-MSB1-Zellen konnten sie 48 und 72 Stunden *post infectionem* (p. i.) zusätzlich zur 2 kb-mRNA mindestens zwei weitere gespleißte Transkripte nachweisen.

Der Ursprung der Replikation ist ein Nonanukleotidmotiv, das innerhalb der Familie *Circoviridae* konserviert ist, aber bei CAV im Gegensatz zu den Vertretern des Genus *Circovirus* nicht innerhalb einer Haarnadelstruktur vorliegt (Todd *et al.*, 2005). Die DNA-Synthese erfolgt vermutlich durch eine rolling circle replication (RCR) (Meehan *et al.*, 1992).

CAV lässt sich in lymphoblastoiden Zelllinien vermehren (McNulty, 1991). In Infektionsexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Virusreplikation *in vitro* hauptsächlich in Hämocytoplasten des Knochenmarks und den Vorläuferzellen der T-Lymphozyten in der Thymusrinde stattfindet (Todd, 2000).

### 2.2.3 Krankheitsbild

CAV führt bei Hühnern ohne maternale Antikörper und Infektion vor der dritten Lebenswoche zu einer klinisch manifesten Erkrankung, der Infektiösen Anämie der Küken (CIA) (von Bülow & Schat, 1997). Die klinischen Symptome reichen von Abgeschlagenheit und Blässe bis zu einer Mortalität von 60 %. Neben der namensgebenden Anämie aufgrund einer Zerstörung der hämatopoetischen Zellen, wird auch eine Immunsuppression beobachtet (McNulty, 1991, Toro *et al.*, 1997, Adair, 2000). Morbidität und Mortalität steigen deutlich an, wenn Küken gleichzeitig mit anderen Viren, wie aviären Reoviren, Adenoviren, Reticuloendotheliose-Virus, Gallid Herpesvirus 2 (GaHV-2) oder Gumborovirus (IBDV), infiziert sind (Rosenberger & Cloud, 1989; Murphy *et al.*, 1999; Toro *et al.*, 2006).

Ab der dritten Woche besteht eine Altersresistenz und Küken erkranken in der Regel nicht mehr (Murphy *et al.*, 1999; Smyth *et al.*, 2006). Die Altersresistenz ist eng an die Fähigkeit der Hühner, Antikörper zu bilden, gebunden (Schat, 2003).

In den 70er und 80er Jahren des 20. Jahrhunderts waren CIA-Ausbrüche weit verbreitet. Die Entdeckung, dass maternale Antikörper die Nachzucht vor einer Erkrankung schützen (Otaki *et al.*, 1992) und darauf folgend die konsequente Impfung kommerzieller Elterntiere haben ermöglicht, dass heutzutage CIA in der Geflügelproduktion praktisch nicht mehr vorkommt.

Auch wenn das Auftreten der klinischen Erkrankung erfolgreich bekämpft wird, ist das Virus immer noch ubiquitär vorhanden, und subklinische Infektionen mit CAV führen zu messbaren Leistungseinbußen in der Broilerproduktion (McNulty *et al.*, 1991). Dies ist durch die virusinduzierte Immunsuppression bedingt, die erstens einen verstärkenden Einfluss auf die Pathogenität zahlreicher Erreger, wie IBDV, GaHV-2, aviäre Reoviren, Newcastle-Disease-Virus (NDV), *Staphylococcus aureus* und *Cryptosporidium* haben (von Bülow & Schat 1997), und sich zweitens negativ auf die Ausbildung einer protektiven Immunität nach Impfung gegen GaHV-2, NDV oder Infektiöser Laryngotracheitis auswirken (Todd, 2004).

## 2.3 Circovirus

Das Genus *Circovirus* umfasst neben den porcinen Circoviren PCV-1 und PCV-2 (Tischer *et al.*, 1974; Ellis *et al.*, 1998) auch verschiedene aviäre Circoviren: BFDV (Pass & Perry, 1984), Pigeon- oder Columbidae Circovirus (PiCV/CoCV) (Woods *et al.*, 1993), Canary-Circovirus (CaCV) (Goldsmith, 1995) und Goose-Circovirus (GoCV) (Soike *et al.*, 1999) (Pringle 1999). Des Weiteren wurden 2005 drei vorläufige Mitglieder, das Duck-Circovirus (DuCV) (Hattermann *et al.*, 2003), das Finch-Circovirus (FiCV) (Myosore *et al.*, 1995) und das bei Möwen nachgewiesene Gull-Circovirus (GuCV) (Twentyman *et al.*, 1999) dem Genus zugeordnet (Todd *et al.*, 2005).

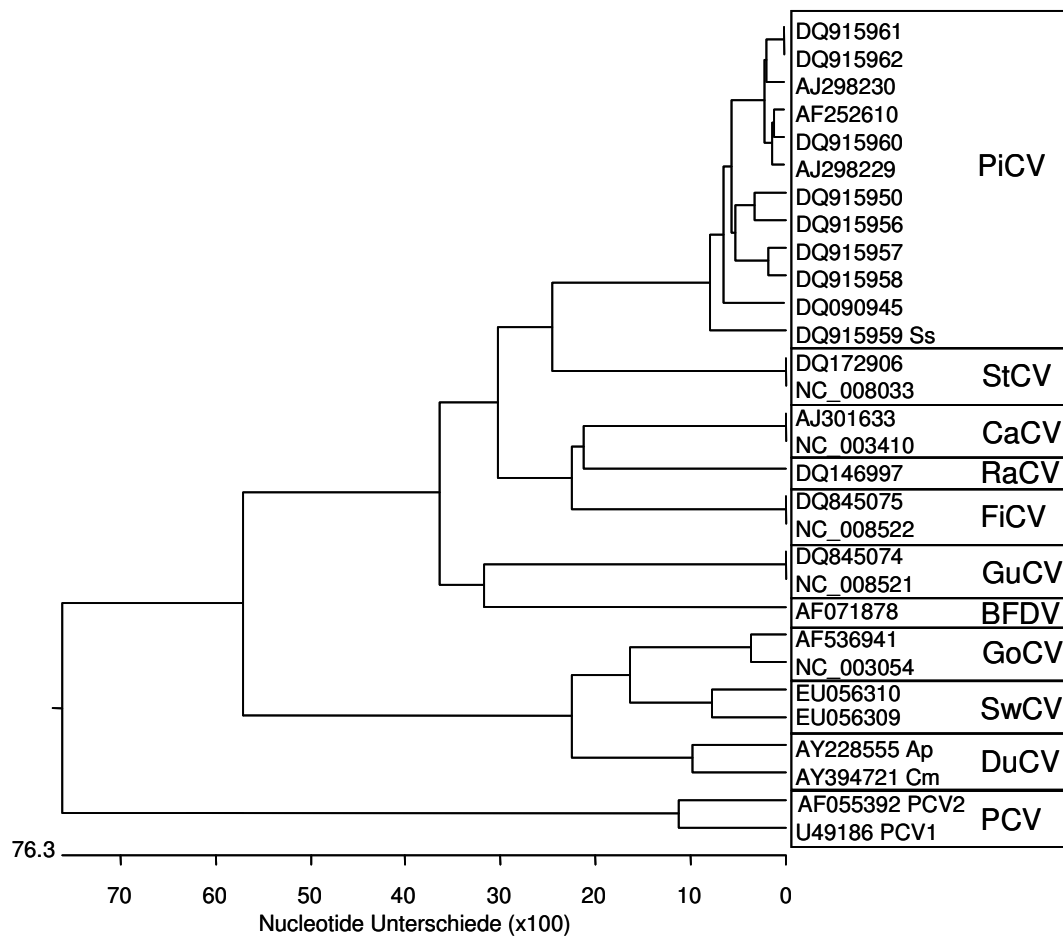
Außerdem konnten bei folgenden Vogelspezies Circoviren nachgewiesen werden, die aber bisher noch nicht durch das International Committee on Taxonomy of Viruses klassifiziert wurden: Im Kot von Straußen (*Struthio camelus*) mit Enteritis konnten elektronenmikroskopisch circovirusähnliche Partikel nachgewiesen werden (Eisenberg *et al.*, 2003). Auf der Basis bekannter Sequenzen anderer Circoviren wurden Konsensus-PCRs für Circoviren entwickelt. Eine Möglichkeit dafür ist der Einsatz von degenerierten Primern, also ein Gemisch aus Primern, die dort, wo es der genetische Code zulässt – meist an der dritten Stelle eines Basentriplets – unterschiedliche Basen aufweisen, um eine Detektion auch bei leichten Abweichungen zu ermöglichen. So gelang Stewart *et al.* (2006) der Nachweis von Circoviren in Neuhollandkrähen (*Corvus coronoides*) (Raven-Circovirus, RaCV), die Federveränderungen aufwiesen. Mit einer von Todd *et al.* (2001b) publizierten Konsensus-PCR konnten Johnne *et al.* (2006) Circoviren in europäischen Staren (*Sturnus vulgaris*) und Einfarbstaren (*Sturnus unicolor*) (Starling-Circovirus, StCV) nachweisen. Halami *et al.* (2008) entwickelten eine Circovirus-Konsensus-PCR, die auf hochkonservierten Bereichen des *rep*-Gens basiert und wiesen so Swan-Circovirus (SwCV) bei Höckerschwänen (*Cygnus olor*) nach. Eine Übersicht über die bisher bekannten Circoviren und circovirusähnlichen Viren ist in Tabelle 1 (Seite 8) dargestellt.

**Tabelle 1:** Übersicht über die bisher bekannten Circoviren und circovirusähnliche Viren.

Virus	Wirt	Erstbeschreibung Charakterisierung	Erkrankung	Genus
<b>PCV-1</b>	Schwein	Tischer <i>et al.</i> , 1974 Tischer <i>et al.</i> , 1982	keine	Circovirus
<b>PCV-2</b>	Schwein	Ellis <i>et al.</i> , 1998 Hamel <i>et al.</i> , 1998	PCVD	Circovirus
<b>BFDV</b>	<i>Psittaciformes</i>	Pass & Perry 1984 Ritchie <i>et al.</i> , 1989	Schnabel- und Federkrankheit der Papageien, Immunsuppression	Circovirus
<b>PiCV</b>	Taube	Woods <i>et al.</i> , 1993 Mankertz <i>et al.</i> , 2000	Jungtaubenkrankheit der Brieftauben, Immunsuppression	Circovirus
<b>CaCV</b>	Kanarienvogel	Goldsmith, 1995 Phenix <i>et al.</i> , 2001	Black Spot, Federveränderungen	Circovirus
<b>GoCV</b>	Gans	Soike <i>et al.</i> , 1999 Todd <i>et al.</i> , 2001a	Kümmern, Immunsuppression, Federveränderungen	Circovirus
<b>DuCV</b>	Moschusente	Hattermann <i>et al.</i> , 2003	Kümmern, Federveränderungen	vorläufiges Mitglied des Genus <i>Circovirus</i>
	Mularde	Soike <i>et al.</i> , 2004	Kümmern, Federveränderungen	vorläufiges Mitglied des Genus <i>Circovirus</i>
<b>FiCV</b>	Fink	Mysore <i>et al.</i> , 1995 Shivaprasad <i>et al.</i> , 2004	Kümmern, Federveränderungen	vorläufiges Mitglied des Genus <i>Circovirus</i>
<b>GuCV</b>	Möwe	Twentyman <i>et al.</i> , 1999 Todd <i>et al.</i> , 2007	Immunsuppression	vorläufiges Mitglied des Genus <i>Circovirus</i>
	Strauß	Eisenberg <i>et al.</i> , 2003	einmaliger Nachweis in einem Fall von Enteritis	
<b>RaCV</b>	Neuhollandkrähe	Stewart <i>et al.</i> , 2006	Federveränderungen	
<b>StCV</b>	Star	Johne <i>et al.</i> , 2006	Klinische Relevanz ungeklärt	
<b>SwCV</b>	Höckerschwan	Halami <i>et al.</i> , 2008	Klinische Relevanz ungeklärt	

Die in den unterschiedlichen Vogelspezies nachgewiesenen Vertreter des Genus *Circovirus* unterscheiden sich deutlich auf Genomebene, was auf eine Wirtsspezifität der aviären Circoviren hinweist (Todd, 2004). In Abbildung 1 (Seite 9) ist eine phylogenetische Analyse von insgesamt 30 Circovirussequenzen aus 11 Spezies dargestellt. Bemerkenswert ist, dass die Circoviren der Schweine (*Sus scrofa*) und Vögel (*Aves*) eigene Cluster bilden. Auch innerhalb der aviären Circoviren sind die Circoviren der Familie der Entenvögel (*Anatidae*) separat gruppiert. Phylogenetische Untersuchungen von aviären und Säugercircoviren im Vergleich mit dem Cytochrom b ihrer Wirte lässt eine Koevolution der Circoviren und ihrer jeweiligen Wirtsspezies ohne Viruseintrag von entfernter verwandten Wirten vermuten (Johne *et al.*, 2006).





**Abbildung 1:** Phylogenetische Analyse von 30 Circovirusisolaten auf der Basis der Nukleotidsequenz der Gesamtgenome. Angegeben sind die accession numbers und die Spezies soweit differierend. Ss bezeichnet ein PiCV-Isolat aus einer Palmtaube (*Streptopelia senegalensis*), Ap steht für ein Isolat aus einer Stockente (*Anas platyrhynchos*), Cm für ein Moschusenten-Isolat (*Cairina moschata*). Der phylogenetische Baum wurde mittels MegAlign (DNASTAR) mit der ClusterW Analyse erstellt.

### 2.3.1 Morphologie

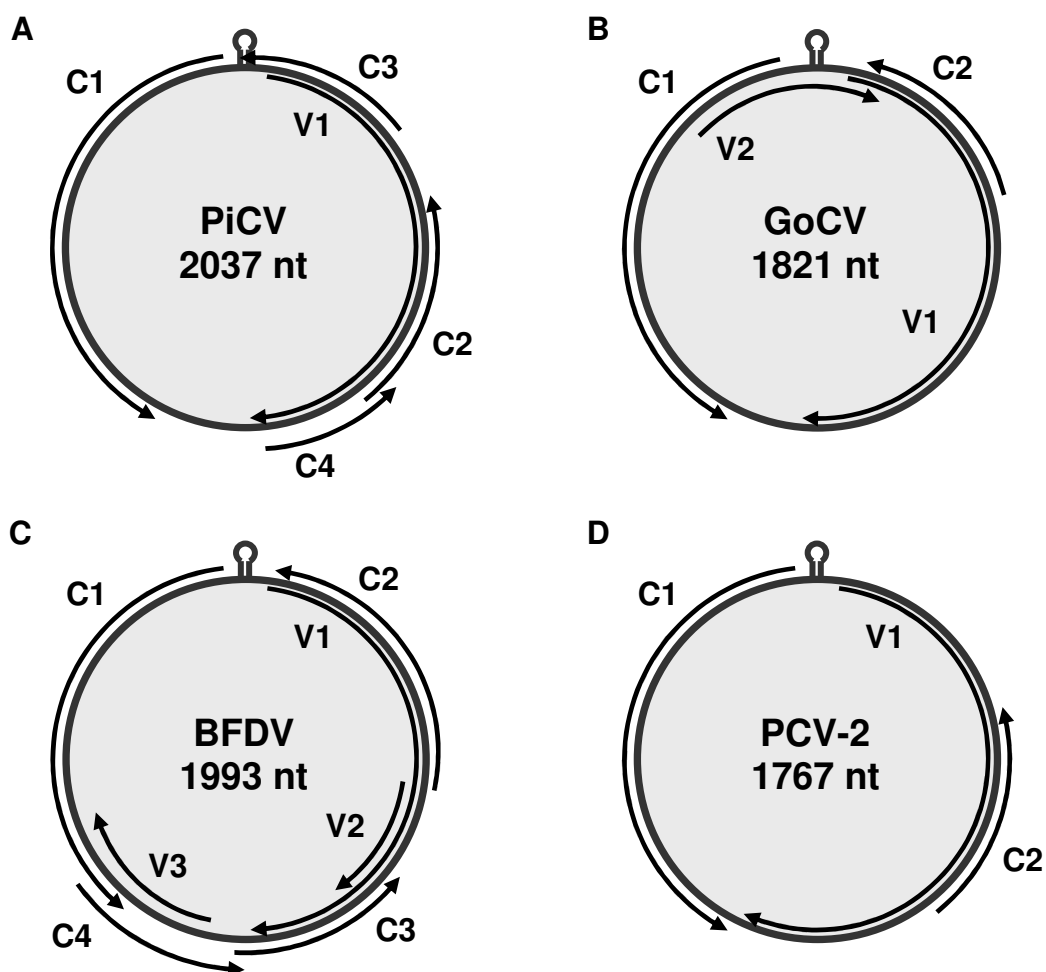
Circovirus-Virionen haben Durchmesser von 12 – 20,7 nm (BFDV) und 17 – 20,7 nm (PCV-1) (Todd *et al.*, 2005). Damit gehören sie zu den kleinsten bisher bekannten animalen Viren.

Die Virusoberflächen von PCV-2 und BFDV bestehen aus zwölf pentameren morphologischen Einheiten, die bei PCV-2 leicht erhaben sind, und dem Virus

einen polygonalen Umriss verleihen, während sie bei BFDV flach sind und die Viruspartikel deshalb rund aussehen (Crowther *et al.*, 2003).

### 2.3.2 Genomorganisation und Virusreplikation

Auf Genomebene unterscheiden sich Circoviren von dem Genus *Gyrovirus* durch die ambisense-Polarität ihres Genoms, das heißt, es liegen mehrere ORFs mit entgegengesetzten Leserichtungen auf ein und demselben DNA-Strang vor (Todd *et al.*, 2005) (Abbildung 2).



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der Genome von (A) PiCV, (B) GoCV, (C) BFDV und (D) PCV-2. Die Positionen der ORFs sind durch schwarze Pfeile markiert, modifiziert nach Todd *et al.* (2001a).

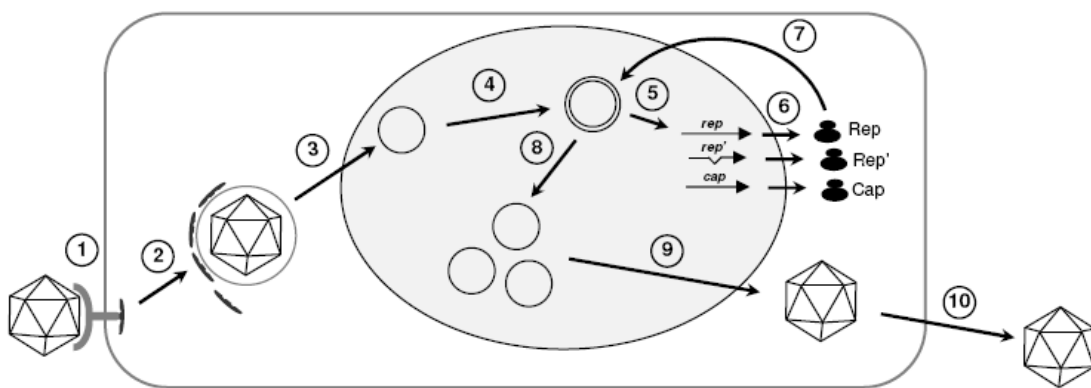
Auf dem Virusstrang wird das Replikase-Protein (Rep) kodiert, das bei PCV-1 und PCV-2 zusätzlich gespleißt als Rep' vorliegt (Mankertz & Hillenbrand, 2001). Das Cap wird vom Komplementärstrang kodiert (Todd *et al.*, 2005). Zusätzlich besitzen Circoviren noch weitere ORFs, aber mit Ausnahme des ORF 3 von PCV wurde deren Expression bisher nicht bewiesen. Der ORF 3 des PCV-2 umfasst 315 nt und kodiert ein Protein, das für die Virusreplikation nicht erforderlich ist, aber eine wichtige Rolle in der Virus-induzierten Apoptose der Wirtszelle spielt (Liu *et al.*, 2005).

Der Replikationsursprung liegt zwischen *rep* und *cap* (Mankertz *et al.*, 1997). Er besteht aus einer Haarnadelstruktur, die in ihrer Spitze das Nonanukleotidmotiv 5'-TAGTATTAC-3' besitzt (Abbildung 5, Seite 16). Diese Haarnadelstruktur ist bei Circo-, Nano- und Geminiviren konserviert, wobei bei den Gyroviren nur das Nonanukleotidmotiv vorhanden ist (Mankertz *et al.*, 2000).

Die Mechanismen der Virusvermehrung wurden bisher bei den porcinen Circoviren am besten untersucht, da sie sich – im Gegensatz zu den aviären Circoviren – in Zellkultur vermehren lassen. Für die PCV-Replikation wird folgendes Modell vorgeschlagen, das in Abbildung 3 (Seite 12) schematisch dargestellt ist:

Das Virus adsorbiert über Glykosaminoglykane an die Wirtszelloberfläche (1) und wird durch eine clathrinvermittelte Endozytose in die Wirtszelle aufgenommen (2). Nach dem uncoating gelangt das ssDNA-Genom vom Zytoplasma in den Zellkern (3). Dort erfolgt – vermutlich durch eine Wirtszell-Polymerase – die Synthese der doppelsträngigen Replikationsform (RF) (4). Von ihr werden *rep* und *cap* mRNAs transkribiert (5) und anschließend die viralen Proteine Rep, Rep' und Cap im Zytoplasma synthetisiert (6) und in den Zellkern reimportiert (7) (Mankertz, 2008). Zu Beginn des Infektionszyklus ist Cap in den Nukleoli lokalisiert, wo es vermutlich eine Arretierung der Wirtszelle in der S-Phase und Modifikation der Proteinsynthese bewirkt. Während des Infektionszykluses akkumulieren Rep, Rep' und Cap im Nukleoplasma (Finsterbusch *et al.*, 2005), wo Rep und Rep' an den Replikationsursprung der doppelsträngigen (ds) RF binden und den kovalent

geschlossenen Virusstrang zwischen den Nukleotiden 7 und 8 des Nonanukleotidmotivs aufbrechen. Durch die Spaltung der Phosphodiesterbindung entsteht an Nukleotid 7 eine freie 3'-Hydroxylgruppe, die als Primer für die anschließende RCR dient. Nach einer (oder mehreren) Replikationsrunde(n) wird der neu synthetisierte Replikationsursprung erkannt und durch Rep und Rep' gespalten und so die DNA-Synthese beendet. Über eine Rep/Rep'-vermittelte Nukleotidyltransfer-Reaktion wird das neu gebildete zirkuläre ssDNA-Molekül abgegeben (8). Die Vorgänge, die zur Reifung (9) und Elution (10) der Nachkommenviren führen, wurden bisher nicht genauer untersucht (Mankertz, 2008).



**Abbildung 3:** Modell für die Vermehrung von PCV. (1) Adsorption; (2) Penetration durch clathrinvermittelte Endozytose; (3) Uncoating und Transport des ssDNA-Genoms in den Zellkern; (4) Bildung einer dsDNA-Replikationsform; (5) Transkription von *rep* und *cap*; (6) Synthese von Rep, Rep' und Cap; (7) Reimport der viralen Proteine in den Zellkern; (8) Synthese von ssDNA-Genomen durch RCR; (9) Reifung und (10) Elution der Nachkommenviren; modifiziert nach Mankertz (2008).

Circoviren vermehren sich in stark teilungsaktiven Zellen, hohe Viruslasten werden in den Zellen des lymphoretikulären Systems, in Haut- und Darmepithelien und in der Leber gefunden (Todd, 2000).

### 2.3.3 Krankheitsbild

Mit Ausnahme von PCV-1, das als apathogen eingestuft wird (Allan & Ellis, 2000), zeigen Circoviren einen deutlichen Tropismus zu lymphoretikulärem Gewebe und Infektionen mit ihnen führen zu einer Immunsuppression (Todd, 2000).

Beim Schwein werden Infektionen mit PCV-2 mit verschiedenen Krankheitsbildern assoziiert, die im europäischen Sprachraum als porcine circovirus diseases (PCVD) und im amerikanischen Sprachraum als porcine circovirus associated diseases zusammengefasst werden. Als derzeit wichtigstes bekanntes Krankheitsbild gilt weltweit das postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) (Chae, 2005). Als weitere PCVD werden das porcine dermatitis and nephropathy syndrome (Rosell *et al.*, 2000; Allan *et al.*, 2000), respiratorische Erkrankungen (Kim *et al.*, 2003; Chae, 2005) und Fertilitätsstörungen (Meehan *et al.*, 2001) beschrieben. In erster Linie sind Absetzferkel von PMWS betroffen. Klinische Symptome sind starke Abmagerung, Blässe, Kümmeren und Dyspnoe, oftmals verbunden mit einer hohen Mortalität (Chae, 2005). Aus epidemiologischer Sicht kann PCV-2 heute als ubiquitär verbreitetes Virus gelten, das weltweit sowohl in Zusammenhang mit PMWS und anderen PCVD, als auch bei gesunden Schweinen nachgewiesen werden kann (Reiner & Willems, 2008). Die Pathogenese ist nicht vollständig geklärt. Die Ausprägung der klinischen Symptomatik sowie die pathomorphologischen Veränderungen werden vom Alter der Tiere zum Zeitpunkt der Infektion, der Virusmenge, dem Virusstamm und von Koinfektionen beeinflusst (Tomás *et al.*, 2008).

Bei Papageien (*Psittaciformes*) wird die Schnabel- und Federkrankheit durch das BFDV verursacht. Dabei handelt es sich um eine Allgemeinerkrankung, die bei vielen verschiedenen Papageienarten auftritt und klassischerweise durch Federverlust, Deformationen und Verfärbungen am Gefieder gekennzeichnet ist. Je nach Alter des betroffenen Vogels, Infektionsdosis, Art der Übertragung und möglicherweise Virulenz des Isolates erkranken die betroffenen Tiere verschieden stark (Latimer *et al.*, 1991). Neben Federveränderungen kommt es durch die Infektion der lymphatischen Organe zu einer teils ausgeprägten Immunsuppression, die in vielen Fällen zum Tod der Vögel durch

Sekundärinfektionen mit wenig pathogenen Mikroorganismen führt (Latimer *et al.*, 1990; Ritchie, 1990).

Über die Krankheitsbilder, die durch Infektionen mit CaCV, GoCV, DuCV, FiCV, GuCV, RaCV, StCV, SwCV hervorgerufen werden, ist bislang wenig bekannt. Analog zu BFDV führen auch Infektionen mit CaCV, GoCV, DuCV, FiCV und RaCV zur Ausbildung von Befiederungsstörungen (Phenix *et al.*, 2001; Soike *et al.*, 1999; Hattermann *et al.*, 2003; Shivaprasad *et al.*, 2004; Stewart *et al.*, 2006). Eine Übersicht über die bisher bekannten Circoviren und der von ihnen verursachten Erkrankungen ist in Tabelle 1 (Seite 8) dargestellt.

## **2.4 Das Pigeon-Circovirus**

### **2.4.1 Morphologie**

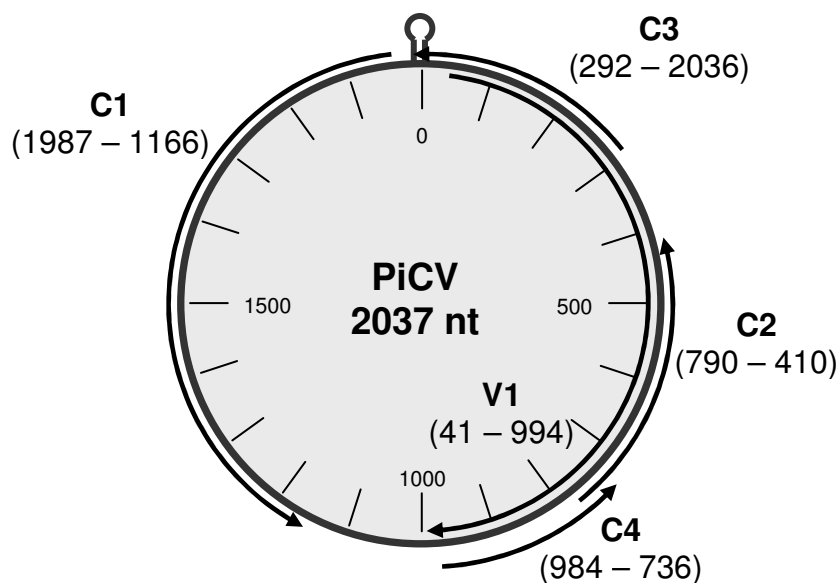
PiCV-Partikel lassen sich in Negativkontrastfärbungen mittels Elektronenmikroskopie als kleine, unbehüllte Partikel ohne erkennbare Oberflächenstruktur darstellen. Die Partikelgröße beträgt in Färbungen mit Phosphorwolframsäure 14 – 16 nm, mit Uranylazetat 16 – 18 nm (Soike *et al.*, 2001). In Einschlusskörperchen werden neben einzelnen Viren auch parakristalline Anordnungen von PiCV-Partikeln gefunden (Woods *et al.*, 1994) (Abbildung 6 B, Seite 22).

### **2.4.2 Genomorganisation und Virusreplikation**

Das Genom besteht aus einem zirkulären DNA-Einzelstrang mit einer Größe zwischen 2032 und 2040 nt (Mankertz *et al.*, 2000; Todd *et al.*, 2008) (Abbildung 4, Seite 15).

Der nächste bisher bekannte Verwandte des PiCV ist das StCV mit einer Aminosäure-Homologie des Kapsidproteins von 52,4 % (Johne *et al.*, 2006), während es innerhalb des Genus *Circovirus* mit den PCV-Typen am weitesten entfernt verwandt ist (Homologie der Gesamtgenome < 40 %) (Mankertz *et al.*, 2000) (Abbildung 1, Seite 9).

Im Genom des PiCV konnten fünf ORFs lokalisiert werden: V1, C1, C2, C3 und C4 (Mankertz *et al.*, 2000). Ihre Nomenklatur wurde von Geminiviren übernommen: Die ORFs des im Virus enthaltenen DNA-Stranges werden mit V (virus strand), die des Komplementärstrangs mit C (complementary strand) bezeichnet. Das PiCV-Genom ist folglich ambisens organisiert (Abbildung 4).



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung des PiCV-Genoms. Die Positionen der ORFs sind durch schwarze Pfeile markiert, die Positionen der Start- und Stopp-Codons stehen in Klammern (nach Todd *et al.*, 2001a)

Die im folgenden Abschnitt angegebenen Nukleotidpositionen, Aminosäuren und Molekulargewichte beziehen sich auf das PiCV-Isolat Ger 1 (accession number AF252610). Als Replikationsursprung wurde eine intergenetische Region zwischen ORF V1 und ORF C1 identifiziert, die in ähnlicher Weise auch bei anderen Circoviren vorkommt. Sie beinhaltet eine Haarnadelstruktur, die durch eine 20 nt lange revertierte Sequenzwiederholung ausgebildet werden kann (Abbildung 5, Seite 16). Zwischen den revertierten Sequenzwiederholungen, an der Spitze der Haarnadelstruktur, befindet sich das Nonanukleotidmotiv 5'-TAGTATTAC-3', das bei PCV als Replikationsursprung charakterisiert wurde (Mankertz *et al.*, 1997), wobei die Replikation an Position 8 des Nonamers

beginnt. Daher wurde dem A<sub>8</sub> dieses Nonamers die Nukleotidposition 1 des PiCV zugeordnet. Weitere Analysen zeigten, dass sich an den Positionen nt 17 - 32 und 51 - 36 sich gegenläufig wiederholende Sequenzen (5'-CACGGAGCCAYATCGC-3') befinden, bei welchen es sich um die Bindungsstelle des Rep handeln könnte. Innerhalb bzw. angrenzend an diese invertierte Sequenzwiederholung wurde viermal ein Hexamer (5'-GGAGCC-3') gefunden (Mankertz *et al.*, 2000).



**Abbildung 5:** Graphische Darstellung der Haarnadel-Struktur. An der Spitze befindet sich das Nonanukleotidmotiv (fett). Der dicke Pfeil markiert den Startpunkt der Replikation bei PCV. Die 16 nt großen, sich gegenläufig wiederholenden Sequenzen sind durch einen gepunkteten Rahmen, die Position und Orientierung des Hexamers 5'-GGAGCC-3' durch dünne Pfeile gekennzeichnet (nach Mankertz *et al.*, 2000).

Als wichtigste ORFs konnten V1 und C1 identifiziert werden: Das V1-Gen (*rep*, nt 41 – 994) kodiert für das Rep mit einer Größe von 317 Aminosäuren (aa) und einem Molekulargewicht von 36,3 kDa. Die Suche nach Sequenzelementen, die



die Expression von *rep* beeinflussen könnten, ergab, dass keine TATA-Box, wohl aber eine CAAT-Box an Position 1835 vorhanden ist. Da die Promoterregion des *rep*-Gens mit der Haarnadelstruktur überlappt, ist von einer komplexen Koregulation der Rep-Synthese und der Replikation auszugehen. Das C1-Gen (*cap*, nt 1987 – 1166) kodiert das Cap mit einer Größe von 273 aa und 31,9 kDa. Die Initiation erfolgt über ein alternatives Startcodon (ATA), das erste interne ATG von *cap* befindet sich an Position 1696. Es ist deshalb möglich, dass von ORF C1 neben Cap in Frame ein kürzeres Peptid (1696 - 1169) synthetisiert wird. In räumlicher Nähe des N-Terminus des Cap ist keine TATA- oder CAAT-Box lokalisiert. Ein Polyadenylierungssignal für das *cap*-Transkript befindet sich an Position 1170 und überlappt somit das Stopp-Codon von *cap*. Der N-Terminus des Kapsidproteins von PiCV wird von den stark basischen Aminosäuren Arginin, Histidin und Lysin dominiert (Mankertz *et al.*, 2000). Der basische N-Terminus ist ein gemeinsames Merkmal der Circoviren, dem verschiedene Funktionen zugeschrieben werden: Bei PCV-2 wurden in diesem Bereich nukleäre und nukleoläre Lokalisationssignale beschrieben, die für die Einschleusung des Proteins in den Zellkern und die Nukleoli verantwortlich sind (Liu *et al.*, 2001; Cheung & Bolin, 2002). Bei BFDV liegt in diesem Bereich außerdem eine DNA-Bindungsstelle, was darauf hindeutet, dass das Kapsidprotein auch an der Einschleusung der viralen DNA in den Zellkern beteiligt ist (Heath *et al.*, 2006). Es wird angenommen, dass in der dreidimensionalen Struktur des Viruskapsid die basischen Aminosäuren mit den sauren Phosphatgruppen der viralen DNA interagieren und so – auf der Innenseite des Kapsid lokalisiert – an der Verpackung des Genoms beteiligt sind (Crowther *et al.*, 2003).

Der ORF C2 (nt 790 – 490) hat eine Größe von 126 aa und 13,7 kDa und ist homolog zu ORF 3 des BFDV, während ORF C3 (nt 292 – 2036; 97 aa; 10 kDa) keine signifikante Homologie zu anderen bekannten Proteinen aufweist. ORF C4 (nt 984 – 736; 81 aa; 8,9 kDa) hingegen besitzt eine begrenzte Homologie zum großen Polymeraseprotein (large polymerase protein) des NDV (Mankertz *et al.*, 2000).

Innerhalb der Spezies Pigeon-Circovirus stellen Todd *et al.* (2008) eine gewisse Diversität fest: Sie verglichen die Genome von zwölf verschiedenen PiCV-Isolaten und konnten zeigen, dass sich die Gesamtgenome auf Nukleotidebene bis zu 14,9 % unterscheiden. Das *rep*-Gen zeigt sich mit einer Homologie von 91,6 % bis 98,3 % konservierter als das *cap*-Gen (76,4 % bis 98,5 %). Dieser Effekt lässt sich auch beim Vergleich der Genome von PCV-1 und PCV-2, BFDV, DuCV, PiCV und GoCV feststellen und wird durch das Modell der darwinistischen Selektion erklärt: Im Bereich des *rep*-Gens findet eine negative Selektion der Mutanten statt, bei denen es durch Nukleotidänderungen zu einem Funktionsausfall des Rep-Proteins kommt. Für das Kapsidprotein wird eine positive Selektion der Mutanten, die durch Nukleotidabweichungen der Immunantwort des Wirts entgehen, angenommen (Hughes & Piontkivska, 2008). Eine Übersicht über alle bisher sequenzierten PiCV-Isolate und ihre Eigenschaften auf Genomebene ist in Tabelle 2 dargestellt.

**Tabelle 2:** Charakteristika der Genome von 12 PiCV-Isolaten, modifiziert nach Todd *et al.* (2008).

Isolat	Genomgröße	ORF V1	ORF C1	ORF C2
accession number (Herkunftsland)		Aminosäuren Startcodon	Aminosäuren Startcodon	Aminosäuren Startcodon
<b>NI 7050</b>	<b>2036 nt</b>	<b>41 – 994*</b>	<b>1986 – 1165</b>	<b>790 – 410</b>
<b>AJ298230</b> (UK)		317 aa ATG	273 aa ATA	126 aa ATG
<b>NI 9030</b>	<b>2037 nt</b>	<b>41 – 994</b>	<b>1987 – 1166</b>	<b>790 – 410</b>
<b>AJ298229</b> (UK)		317 aa ATG	273 aa ATA	126 aa ATG
<b>Ger 1</b>	<b>2037 nt</b>	<b>41 – 994</b>	<b>1987 – 1166</b>	<b>790 – 410</b>
<b>AF252610</b> (Deutschland)		317 aa ATG	273 aa ATA	126 aa ATG
<b>Bel 936</b>	<b>2038 nt</b>	<b>48 – 995</b>	<b>1988 – 1167</b>	<b>791 – 411</b>
<b>DQ915956</b> (Belgien)		316 aa ATG	273 aa ATG	126 aa ATG
<b>Bel 18</b>	<b>2032 nt</b>	<b>48 – 995</b>	<b>1978 – 1166</b>	<b>791 – 411</b>
<b>DQ915957</b> (Belgien)		316 aa ATG	270 aa ATG	126 aa ATG
<b>Bel 20</b>	<b>2032 nt</b>	<b>48 – 995</b>	<b>1978 – 1166</b>	<b>791 – 411</b>
<b>DQ915958</b> (Belgien)		316 aa ATG	270 aa ATG	126 aa ATG
<b>Fra A40042</b>	<b>2037 nt</b>	<b>41 – 994</b>	<b>1987 – 1166</b>	<b>790 – 410</b>
<b>DQ915960</b> (Frankreich)		317 aa ATG	273 aa ATA	126 aa ATG
<b>Ita 4B</b>	<b>2040 nt</b>	<b>48 – 995</b>	<b>1990 – 1166</b>	<b>791 – 411</b>
<b>DQ915950</b> (Italien)		315 aa ATG	274 ATG	126 aa ATG

Isolat	Genomgröße	ORF V1	ORF C1	ORF C2
<b>accession number</b>		Aminosäuren	Aminosäuren	Aminosäuren
(Herkunftsland)		Startcodon	Startcodon	Startcodon
<b>US 93A</b>	<b>2037 nt</b>	<b>41 – 994</b>	<b>1987 – 1166</b>	<b>790 – 410</b>
<b>DQ915961</b>		317 aa	273 aa	126 aa
(USA)		ATG	ATA	ATG
<b>US 002180</b>	<b>2037 nt</b>	<b>41 – 994</b>	<b>1987 – 1166</b>	<b>790 – 410</b>
<b>DQ915962</b>		317 aa	273 aa	126 aa
(USA)		ATG	ATA	ATG
<b>Chi zj1</b>	<b>2039 nt</b>	<b>41 – 994</b>	<b>1986 - 1165</b>	<b>790 – 410</b>
<b>DQ090945</b>		317 aa	273 aa	126 aa
(China)		ATG	ATG	ATG
<b>Dove</b>	<b>2039 nt</b>	<b>41 – 994</b>	<b>1986 - 1165</b>	<b>790 – 410</b>
<b>DQ915959</b>		317 aa	273 aa	126 aa
(Australien)		ATG	ATG	ATG

\* Nukleotidposition

Wie alle Vertreter der Familie *Circoviridae* erfolgt die Vermehrung von PiCV über eine RCR im Zellkern der Wirtszelle und ist in DNA-Replikation und Proteinsynthese von Wirtszellfaktoren abhängig (Todd *et al.*, 2005). In PiCV-infizierten Tauben wurden B-Lymphozyten als Hauptzielzellen der Virusreplikation bestimmt (Abadie *et al.*, 2001).

### 2.4.3 Verbreitung

PiCV-Infektionen wurden erstmals in den Vereinigten Staaten von Amerika beschrieben (Woods *et al.*, 1993). In einer retrospektiven Studie konnten PiCV-typische Veränderungen zurück bis in das Jahr 1986 in einer Taube aus Kanada gefunden werden (Woods *et al.*, 1994). Seitdem wurde das Virus in Tauben aus Südafrika (Gerdes, 1993), Australien, Großbritannien (Smyth & Carroll, 1995), Deutschland (Soike, 1997), Italien (Coletti *et al.*, 2000), Frankreich (Abadie *et al.*, 2001) und der Tschechischen Republik (Taras *et al.*, 2003) nachgewiesen. Heute geht man von einer weltweiten Verbreitung des Taubencircovirus aus (Todd, 2004).

Während sich die frühen Untersuchungen meist auf Brieftauben konzentrierten, wurden um die Jahrtausendwende auch in Rasse- und Masttauben Pigeon-Circovirus detektiert (Paré *et al.*, 1999; Abadie *et al.*, 2001; Roy *et al.* 2003; Taras *et al.*, 2003; Franciosi *et al.*, 2005; Freick, 2006; Todd *et al.*, 2008).

In Australien wurden bei wild lebenden Palmtauben (*Streptopelia senegalensis*) Befiederungsstörungen beobachtet, die dem klinischen Bild der Schnabel- und Federkrankheit der Papageien entsprechen. Das aus Federn gewonnene Virus zeigte aber im Gegensatz zu BFDV keine hämagglutinierenden Eigenschaften (Pass *et al.*, 1994; Raidal & Riddoch, 1997). Durch die Sequenzierung konnten Todd *et al.* (2008) zeigen, dass es sich um ein Pigeon-Circovirus handelt.

#### **2.4.4 Krankheitsbild**

Bisher wurden Infektionen mit Pigeon-Circovirus bei Vertretern zweier Arten aus zwei unterschiedlichen Gattungen nachgewiesen: bei der domestizierten Form der Felsentaube aus der Gattung der Feldtauben (*Columba*) (Woods *et al.*, 1993) und bei Palmtauben aus der Gattung der Turteltauben (*Streptopelia*) (Pass *et al.*, 1994). Da eine PiCV-Infektion bei diesen beiden Arten zu unterschiedlichen Krankheitsbildern führt, werden sie separat besprochen.

##### **2.4.4.1 Haustauben**

Eine Infektion mit PiCV führt bei Haustauben nicht zwangsläufig zu einer klinischen Erkrankung. Neben dem Nachweis einer PiCV-Infektion in erkrankten Jungtauben konnte PiCV auch in klinisch gesunden Tauben nachgewiesen werden (Paré *et al.*, 1999; Hattermann *et al.*, 2002; Todd *et al.*, 2002; Franciosini *et al.*, 2005; Raue *et al.*, 2005; Duchatel *et al.*, 2006, Freick, 2006).

Welche Faktoren den Verlauf einer PiCV-Infektion bestimmen, ist bisher nicht bekannt. Man geht davon aus, dass es sich um ein multifaktorielles Geschehen handelt. In diesem Zusammenhang werden verschiedene Variablen, die das Infektionsgeschehen beeinflussen, diskutiert: die Pathogenität des PiCV-Stamms (Abadie *et al.*, 2001; Freick, 2006), die individuelle Empfänglichkeit (Abadie *et al.*, 2001) sowie das Alter des Wirts (Woods *et al.*, 1994; Shivaprasad *et al.*, 1994; Woods & Shivaprasad, 1997), der Infektionsdruck (Duchatel *et al.*, 2006), exogene Stressoren, wie Hitze oder Besatzdichte, (Raue *et al.*, 2005) und

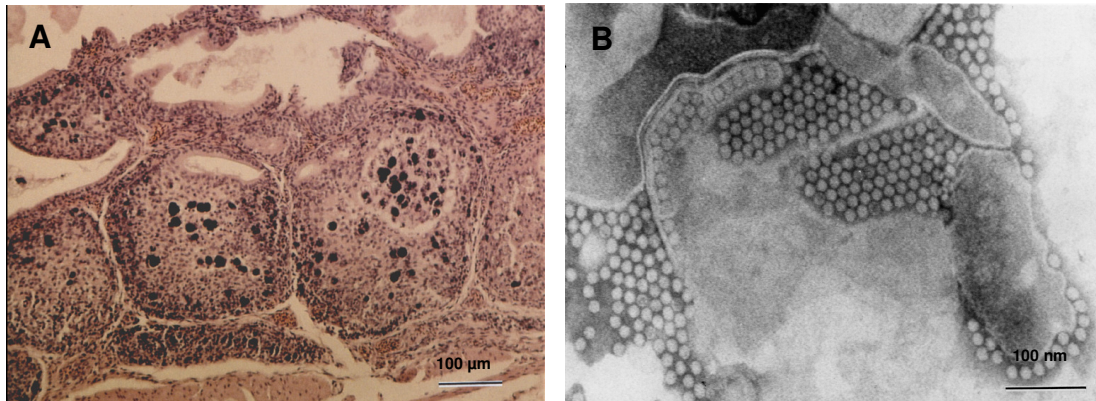
Sekundärinfektionen (Woods & Shivaprasad 1997; Raue *et al.*, 2005; Scullion & Scullion, 2007; Schmidt, 2007).

Eine klinisch manifeste Erkrankung wird in der Regel bei Tauben zwischen der vierten Lebenswoche und dem vierten bis sechsten Lebensmonat beschrieben (Shivaprasad *et al.*, 1994; Smyth *et al.*, 2001; Roy *et al.*, 2003).

Erkrankte Tauben, bei denen PiCV nachgewiesen wurde, zeigten eine unspezifische klinische Symptomatik, wie z. B. Lethargie, Anorexie, Ataxie, Leistungsminderung, Gewichtsverlust, Atemwegssymptome, Durchfall oder erhöhte Jungtiersterblichkeit (Woods *et al.*, 1994; Woods & Shivaprasad, 1997; Soike, 1997). Das klinische Bild wird häufig von den bakteriellen, mykotischen, parasitären oder viralen Sekundärinfektionen geprägt (Woods & Shivaprasad, 1997; Soike *et al.*, 2001). Aus diesem Grund schwankt die Mortalität in Beständen je nach Ausbruch zwischen 0 und 100 % (Woods & Shivaprasad, 1997).

PiCV-spezifische Veränderungen beschränken sich im Wesentlichen auf lymphoretikuläre Gewebe (Soike *et al.*, 2001). Pathohistologisch lassen sich Läsionen an den primär und sekundär lymphatischen Organen und Geweben wie Bursa Fabricii, Milz, Caecaltonsillen, dem darmassoziierten lymphatischen Gewebe und dem bronchusassoziierten lymphatischen Gewebe feststellen. Insbesondere werden follikulär-lymphatische Hyperplasie, Nekrose der lymphatischen Zellen, zystische Atrophie sowie verschiedene Schweregrade einer lymphatischen Depletion und einer Lymphozyteninfiltration gefunden (Shivaprasad *et al.*, 1993; Paré *et al.*, 1999; Coletti *et al.*, 2000; Abadie *et al.*, 2001; Smyth *et al.*, 2001; Soike *et al.*, 2001; Roy *et al.*, 2003). Bei einem Teil der PiCV-infizierten Tauben wurden basophile, botroide, zytoplasmatische Einschlusskörperchen, besonders in den primären und sekundären lymphatischen Organen und in Lymphozyten und Makrophagen, gefunden (Abbildung 6 A, Seite 22) (Woods *et al.*, 1993; Woods *et al.*, 1994; Soike, 1997; Coletti *et al.*, 2000; Abadie *et al.*, 2001; Soike *et al.*, 2001). Im elektronenmikroskopischen Bild erscheinen Einschlüsse in Organen als parakristalline Strukturen, die aus dicht gepackten Viruspartikeln

bestehen (Abbildung 6 B, Seite 22) (Woods *et al.*, 1994; Paré *et al.*, 1999; Abadie *et al.*, 2001).



**Abbildung 6:** (A) Bursa Fabricii einer PiCV-infizierten Jungtaube mit zahlreichen Einschlusskörperchen in den medullären und kortikalen Follikelzellen, Hämatoxylin-Eosin-Färbung (B) transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von PiCV-Partikeln in Negativkontrast-Färbung mit Phosphorwolframsäure (gedruckt mit der freundlichen Genehmigung von Dr. D. Soike, Teltow/Ruhlsdorf)

Blutuntersuchungen von infizierten Tauben durch Paré *et al.* (1999) zeigten keine Veränderungen in Erythrozytenzahl, Hämoglobinkonzentration und Gesamteiweiß, aber eine sehr hohe Variabilität der Leukozytenzahl, die jedoch nicht mit dem Grad der Veränderungen in der Bursa Fabricii korrelierte. Coletti *et al.* (2000) wiesen einen signifikanten Anstieg der heterophilen Granulozyten und eine signifikante Abnahme der Lymphozyten bei Tauben mit Atrophie der lymphatischen Organe nach. Schmidt (2007) konnte eine Korrelation zwischen der klinischen Symptomatik und dem weißen Blutbild feststellen: Während Tauben mit klinischer Symptomatik signifikant häufiger eine Heterophilie aufwiesen, wurde bei Tauben ohne Symptome signifikant gehäuft eine Leukopenie festgestellt.

#### 2.4.4.2 Palmtauben

Bisher gibt es nur zwei Berichte einer Circovirusinfektion von Palmtauben (Pass *et al.*, 1994; Raidal & Riddoch, 1997).

Sieben von Raidal & Riddoch (1997) untersuchte Palmtauben (*Streptopelia senegalensis*) zeigten Federveränderungen, die denen der Schnabel- und Federkrankheit der Papageien entsprechen: bilateralen, symmetrischen Federverlust und dystrophische Federn mit zirkulären Einschnürungen an der Federspule. Hauptsächlich waren Schwung- und Steuerfedern von diesen Veränderungen betroffen. Histologisch wurden eine Nekrose epidermaler Zellen und mittelgradige Leukozyteninfiltration in die Federpulpa nachgewiesen. Mittels Elektronenmikroskopie wurden in homogenisiertem Federmaterial Circoviruspartikel detektiert.

Diese Untersuchungen lassen darauf schließen, dass eine PiCV-Infektion bei Palmtauben, im Gegensatz zu einer Infektion bei Haustauben, zu Befiederungsstörungen führt. Ob und inwieweit es auch bei Palmtauben zu einer Schädigung des Immunsystems kommt, ist bisher nicht untersucht worden.

#### **2.4.5 Prävalenz**

Untersuchungen zum Vorkommen von PiCV liefern je nach Detektionsmethode und Patientengut unterschiedliche Angaben.

In Kalifornien, USA, wurden durch das California Veterinary Diagnostic Laboratory System in den Jahren 1990 bis 1993 bei 2,4 % der untersuchten Tauben (n = 495) histologisch circovirustypische Veränderungen in den lymphatischen Geweben gefunden (Woods *et al.*, 1994). In Belgien wurde durch Tavernier *et al.* (2000) mit derselben Methode eine Prävalenz von 19 % (n = 158) bestimmt. Mittels Negativkontrast-Elektronenmikroskopie bestimmten Soike *et al.* (2001) eine PiCV-Infektion bei 48 % von 176 untersuchten klinisch erkrankten Jungtauben.

Die Sequenzierung des PiCV-Genoms im Jahr 2000 durch Mankertz *et al.* ermöglichte die Entwicklung sensitiverer molekularbiologischer Nachweismethoden. Im Rahmen einer Studie der Universität Leipzig in Zusammenarbeit mit dem Verband Deutscher Brieftaubenzüchter e. V. zur Ätiologie der Jungtaubenkrankheit wurden sowohl Tiere aus betroffenen

Beständen (45 Tauben aus 15 Schlägen) als auch Tiere ohne klinische Symptomatik aus Beständen, in welchen bis zu diesem Zeitpunkt keine PiCV-Infektion nachgewiesen wurde (sechs Tiere aus drei Schlägen), untersucht. Mittels PCR konnte PiCV-DNA in 92 % der Tauben aus 17 Schlägen nachgewiesen werden (Freick, 2006).

In den genannten Studien lag der Schwerpunkt der Untersuchungen auf klinisch erkrankten Tauben bzw. Beständen mit erhöhten Jungtierverlusten. Die in ihnen ermittelten Werte können also nicht direkt auf die Gesamtpopulation übertragen werden. Die Tatsache, dass Pigeon-Circovirus auch regelmäßig in den in die Untersuchung einbezogenen gesunden Tauben detektiert wurde, lassen aber den Schluss zu, dass ein hoher Anteil aller Tauben infiziert ist.

Bisher liegen auch keine Untersuchungen zur Verbreitung von PiCV in der Wildtaubenpopulation vor. Hattermann *et al.* (2002) konnten in einer Untersuchung von Blutproben von sieben Stadt- und zwei Wildtauben mittels PCR keine PiCV-DNA nachweisen.

#### **2.4.6 Nachweis**

Die ersten Circovirusinfektionen wurden mittels Elektronenmikroskop in Milz- und Bursafollikeln (Woods *et al.*, 1993; Wodds *et al.*, 1994; Shivaprasad *et al.*, 1994; Soike, 1997; Coletti *et al.*, 2000; Soike *et al.*, 2001) oder über eine histologische Untersuchung lymphatischer Organe (Paré *et al.*, 1999) nachgewiesen.

Nach der Sequenzierung des PiCV-Genoms (Mankertz *et al.*, 2000) wurden molekularbiologische Nachweisverfahren entwickelt, die sich in vergleichenden Untersuchungen sensitiver als histologische und elektronenmikroskopische Untersuchungen erwiesen. So konnten Smyth *et al.* (2001) mittels *in-situ*-Hybridisierung (ISH) in der Bursa Fabricii von 89 % der untersuchten Tauben (n = 107) PiCV-DNA nachweisen, während die histologische Untersuchung nur 66 % positive Tiere detektierte. Soike *et al.* (2001) verglichen die Befunde aus elektronenmikroskopischen und histologischen Untersuchungen mit dem Nachweis von PiCV-DNA über ISH und PCR. Dabei konnte gezeigt werden, dass



der PiCV-Nachweis mit der dort eingesetzten PCR den anderen verwendeten Methoden überlegen war. 2002 untersuchten Todd *et al.* 32 Brieftauben parallel histologisch und mittels PCR, ISH, Dot-blot-Hybridisierung (DBH). Dabei konnte festgestellt werden, dass die PCR mit 84 % der untersuchten Tiere die meisten positiven Ergebnisse lieferte, während mittels ISH, DBH und Histologie nur in 75, 63 bzw. 41 % der untersuchten Tauben eine PiCV-Infektion nachweisbar war.

Heutzutage erfolgt der PiCV-Nachweis über die Detektion von viraler DNA durch PCR zur Bestätigung klinischer und/oder histologischer Verdachtsdiagnosen. Von folgenden Autoren wurden PiCV-spezifische PCRs entwickelt und publiziert: Soike *et al.*, 2001, Todd *et al.*, 2002, Roy *et al.*, 2003, Franciosini *et al.*, 2005, Todd *et al.*, 2006 und Freick *et al.*, 2008.

Als Probenmaterial sind primär lymphatische Organe – besonders die Bursa Fabricii – zur Untersuchung auf eine PiCV-Infektion geeignet, da sich PiCV vorrangig in den Zellen des lymphoretikulären Systems vermehrt (Soike *et al.*, 2001; Todd *et al.*, 2002). Es können aber auch regelmäßig positive Ergebnisse durch Untersuchung von Leber, Lunge, Trachea, Niere, Blut und Serum erreicht werden (Soike *et al.*, 2001; Hattermann *et al.*, 2002; Franciosini *et al.*, 2005; Raue *et al.*, 2005; Duchatel *et al.*, 2006; Freick, 2006; Freick *et al.*, 2008).

Trotz der Verfügbarkeit einer Reihe hochsensitiver molekularbiologischer Nachweisverfahren bleibt die *intra vitam*-Diagnose einer PiCV-Infektion schwierig: Selbst durch wiederholte Untersuchungen von Blutproben, Tracheal-, Pharynx- und Kloakenabstrichen konnten nicht alle Tiere identifiziert werden, bei welchen in den inneren Organen PiCV-DNA nachweisbar war (Franciosini *et al.*, 2005; Duchatel *et al.*, 2006; Todd *et al.*, 2006). Eine Untersuchung auf PiCV am lebenden Tier ist demnach nur im positiven Fall beweisend.

Ein weiterer Punkt, der die Diagnostik auf molekularbiologischer Ebene erschwert, ist die Diversität der einzelnen PiCV-Isolate. Deshalb sollten für den Nachweis von PiCV-DNA Primer und Sonden für hochkonservierte Bereiche ausgewählt werden, um das Risiko, neue PiCV-Isolate nicht zu erkennen, zu minimieren. Alle zum

jetzigen Zeitpunkt sequenzierten Tauben-Isolate werden von einer PCR von Todd *et al.* (2006), die auf dem *rep*-Gen und der hochkonservierten Genregion zwischen *rep* und *cap* basiert, erkannt (Todd *et al.*, 2008).

Ein anderer Aspekt, der bei der Interpretation eines PCR-Befundes beachtet werden muss, ist die Tatsache, dass auch in klinisch gesunden Tauben PiCV-DNA nachweisbar ist (Paré *et al.*, 1999; Hattermann *et al.*, 2002; Todd *et al.*, 2002; Franciosini *et al.*, 2005; Raue *et al.*, 2005; Duchatel *et al.*, 2006; Freick, 2006). Deshalb ist der Einsatz der molekularbiologischen Methoden zur ätiologischen Untersuchung eines Krankheitsgeschehens nur eingeschränkt geeignet (Todd *et al.*, 2002).

#### **2.4.7 Pathogenese**

Die Pathogenese einer PiCV-Infektion ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht vollständig geklärt. Verschiedene Tatsachen haben dazu geführt, dass allgemein akzeptiert wird, dass eine PiCV-Infektion eine Immunsuppression induzieren kann (Woods *et al.*, 1994; Woods & Shivaprasad, 1997; Todd, 2000; Todd, 2004; Todd *et al.*, 2005): Erstens die Tatsache, dass das klinische Bild von Sekundärinfektionen bestimmt wird. So wiesen Soike *et al.* (2001) nach, dass aus PiCV-infizierten Tauben häufiger Erreger mit geringer Pathogenität für Tauben isoliert werden können als aus PiCV-negativen Tauben. Zweitens führen Infektionen mit den nah verwandten Viren CAV, PCV-2 und BFDV zu einer Immunsuppression des Wirts (McNulty *et al.*, 1991; Todd, 2000, Todd, 2004). Auch wird für PiCV analog zu CAV ein negativer Einfluss der Infektion auf den Impferfolg bei Impfungen gegen andere Erreger beschrieben (Woods & Shivaprasad, 1997; Soike *et al.*, 2001). Drittens wird pathohistologisch ein Tropismus von PiCV zu Zellen des lymphoretikulären Systems und deren Zerstörung beobachtet, woraus vermutlich eine schwerwiegende Schädigung des Immunsystems resultiert (Woods & Shivaprasad, 1997; Soike *et al.*, 2001).

Abadie *et al.* (2001) untersuchten 15 PiCV-infizierte Tauben histologisch, immunhistochemisch und mittels ISH und schlagen eine Pathogenese vor, die in drei Stadien unterteilt werden kann:

- 1) Im Frühstadium der Infektion befällt das Virus die Makrophagen der Bursa Fabricii, hauptsächlich im Mark, aber auch in der Rinde der Bursafollikel. Außerdem werden vermehrt pyknotisch veränderte Lymphozyten gefunden.
- 2) Im weiteren Verlauf kommt es zu einer systemischen Ausbreitung im Organismus. Ab diesem Zeitpunkt können auch Einschlusskörperchen in den anderen lymphatischen Organen (Thymus, Milz, darm- und bronchusassoziiertem lymphatischen Gewebe) nachgewiesen werden. Bei einigen Tieren wurde eine Hyperplasie der Lymphozyten gefunden, die als Immunreaktion auf die Dissemination der PiCV-Infektion gewertet werden kann.
- 3) Das letzte Stadium ist durch zahlreiche Sekundärinfektionen geprägt, deren Wegbereiter die virusinduzierte Immunsuppression darstellt. Es kommt zu einer schweren akuten nekrotisierenden Bursitis, die meist mit einem, die Bursa-Architektur ersetzenden, fibrino-purulenten Exsudat einhergeht.

Allgemein konnte gezeigt werden, dass die Apoptoserate der Lymphozyten der Bursa Fabricii in PiCV-infizierten Tauben, verglichen mit der physiologischen, altersbedingten Involution der Bursa Fabricii in gleichalten nicht-infizierten Tauben, deutlich anstieg. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass eine PiCV-induzierte Lymphozytendepletion und die daraus resultierende Immunsuppression zumindest zum Teil durch die Aktivierung der Apoptose in Lymphozyten verursacht werden. Als ein weiteres charakteristisches Merkmal einer PiCV-Infektion wurde die Abwesenheit eines signifikanten entzündlichen Prozesses, besonders im Frühstadium der Infektion, beobachtet (Abadie *et al.*, 2001).

### 2.4.8 Übertragung

Die Übertragung erfolgt vermutlich horizontal über die Ingestion oder Inhalation von virushaltigem Kot (Gerdes, 1993; Woods *et al.*, 1993; Woods & Shivaprasad, 1997; Franciosini *et al.*, 2005).

Zur Übertragung über das Ei, die für CAV bekannt ist (Hoop, 1992), gibt es widersprüchliche Untersuchungsergebnisse. Für eine vertikale Übertragung sprechen der Nachweis von PiCV-DNA in Organen von 2 von 2 (Soike *et al.* 2001), 5 von 44 (Duchatel *et al.* 2005) und 8 von 22 (Duchatel *et al.*, 2006) untersuchten Taubenembryonen sowie in 2 von 14 Ovar- und 2 von 6 Hodengeweben von Alttauben (Duchatel *et al.*, 2006). Freick (2006) hingegen konnte in 19 embryonierten und 18 Taubeneiern ohne sichtbaren Embryo aus PiCV-positiven Beständen keine PiCV-DNA detektieren.

Eine Übertragung über Kropfmilch scheint unwahrscheinlich, da Duchatel *et al.* (2005) in Kropfabstrichen von 64 adulten Tauben mit sehr junger Nachzucht aus PiCV-positiven Schlägen keine PiCV-DNA nachweisen konnten.

Die Infektionsquelle für Jungtauben stellen wahrscheinlich persistent infizierte Alttauben dar, die das Virus über Kot, Körpersekrete und Federstaub ausscheiden und so horizontal auf die Jungtauben übertragen (Franciosini *et al.*, 2005; Duchatel *et al.*, 2006; Freick, 2006). Durch wiederholte Untersuchungen von Kloakentupfern von 19 Jungtauben auf PiCV-DNA konnten Duchatel *et al.* (2006) zeigen, dass es nach dem Absetzen zu einem sprunghaften Anstieg der Anzahl der PiCV-ausscheidenden Jungtauben kam: Während am 15., 28. und 37. Lebenstag nur bei 21 %, 5 % bzw. 16 % eine Virusausscheidung nachweisbar war, waren am 51. Lebenstag die Kloakenabstriche aller Tauben PiCV-positiv. Die Autoren schließen daraus, dass einzelne PiCV-infizierte Jungtauben nach dem Absetzen das Virus auf andere Jungtauben übertragen, und deshalb im Hinblick auf die epidemiologische Relevanz und Prophylaxemaßnahmen die horizontale Übertragung von größerer Bedeutung ist als ein möglicher vertikaler Übertragungsweg.

#### **2.4.9 Die Jungtaubenkrankheit**

Bei Brieftauben wird seit über zwei Jahrzehnten von Züchtern und Tierärzten in Mitteleuropa, vor allem aus Deutschland, ein Krankheitskomplex beschrieben, der zu teilweise hohen Verlusten bei Jungtauben führt (Kamphausen, 2002; Zumbusch, 2002; Reitz *et al.*, 2003). Dieser wurde früher – in Anlehnung an einen häufig beobachteten pathologisch-anatomischen Befund bzw. ein vermutetes ätiologisches Agens – als Geschwollener-Darm-Syndrom (Warzecha, 2002) oder Mooskrankheit (Zumbusch, 2002) bezeichnet. Heute ist dieser Krankheitskomplex als Jungtaubenkrankheit oder young pigeon disease syndrom bekannt (Raue *et al.*, 2005) und tritt auch außerhalb Europas auf (Walker, 2002).

Die Jungtaubenkrankheit ist gekennzeichnet von folgenden klinischen Symptomen: Erbrechen, Appetitlosigkeit, einem flüssigkeitsgefüllten Kropf, Flugunlust, Kropfstase, gesträubtem Gefieder, Durchfall, Abmagerung, Mattigkeit und Tod. Die Morbidität und Mortalität beträgt unter 20 % (Reitz *et al.*, 2003).

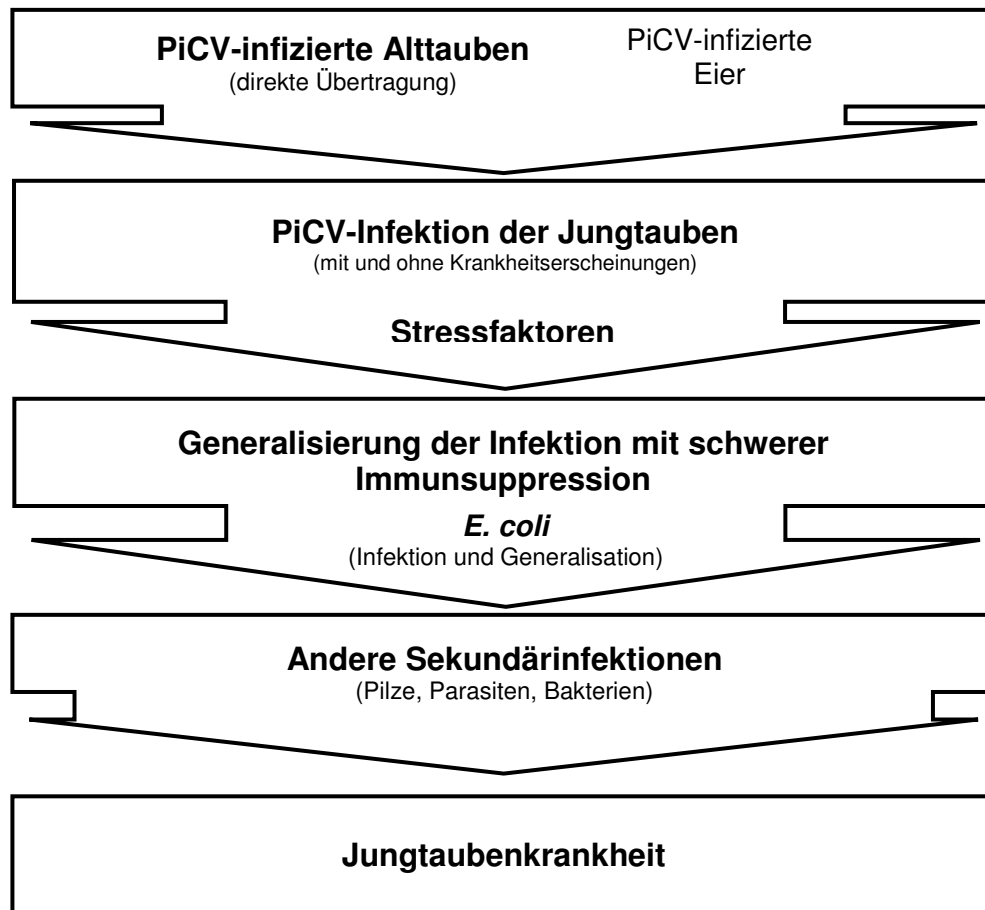
Stoiber (2003) beschreibt zwei Verlaufsformen der Jungtaubenkrankheit. Die erste Form ist durch das Auftreten der beschriebenen Symptome gekennzeichnet. Die betroffenen Tauben verenden drei bis sieben Tage nach Beginn der Erkrankung. Bei der zweiten Verlaufsform kommt es zu plötzlichen Todesfällen nach Freiflug, insbesondere nach Trainingsflügen in den Sommermonaten.

Auch die Autoren Grund (2002), Warzecha (2002) und Kamphausen (2002) berichten von einem gehäuftem Auftreten der Jungtaubenkrankheit in den Sommermonaten in Verbindung mit den ersten Flügen und dem ersten Zusammentreffen mit bestandsfremden Tauben. Die Ursache hierfür sehen die Autoren in der starken Belastung des Immunsystems sowie dem hohen Infektionsdruck.

In der Regel dauert die Ausbreitung im Bestand zwei bis vier Tage, es können aber auch Wochen vergehen. Die Geschwindigkeit der Ausbreitung ist abhängig vom Infektionsdruck, den beteiligten Erregern und dem Immunstatus der Tiere.

Die Pathogenese und Ätiologie dieses Krankheitskomplexes konnten bis heute nicht abschließend geklärt werden. Über zahlreiche nicht-infektiöse Ursachen und infektiöse Agenzien, die dieses Syndrom hervorrufen, wurde diskutiert, z. B. *Spironucleus columbae*, *Escherichia coli* (*E. coli*), aviäre Adenoviren und insbesondere Pigeon-Circovirus (Freick, 2006). In Untersuchungen von Raue *et al.* (2005) wurde in allen untersuchten Tauben (n = 45) aus Beständen mit Jungtaubenkrankheit PiCV-DNA nachgewiesen. Drei von sechs untersuchten Tauben aus Beständen ohne Jungtaubenkrankheit waren ebenfalls PiCV-positiv. Die Autoren schließen aus ihren Untersuchungen, dass die Jungtaubenkrankheit ein multifaktorielles Geschehen ist, bei dessen Entstehung PiCV – vermutlich durch eine virusinduzierte Immunsuppression – eine entscheidende Rolle spielt.

Freick (2006) schlägt folgende Pathogenese vor, die in Abbildung 7 (Seite 31) schematisch dargestellt ist: Jungtauben, deren Immunsystem noch nicht ausreichend entwickelt ist, sind oder werden mit PiCV infiziert. Sind diese Tauben zusätzlich Stressoren, wie z. B. Überbesatz der Schläge, heißem Wetter oder der Jungtaubenreise, ausgesetzt, kommt es zur klinisch manifesten Erkrankung. Die Stressoren führen zu einer verstärkten Virusreplikation, die in erster Linie in den lymphatischen Organen und Geweben stattfindet. Das führt zum Absterben der infizierten Zellen und somit zu einer Depletion der Lymphfollikel in der Bursa Fabricii und anderen lymphatischen Geweben. Daraus resultiert eine Immunsuppression. Diese trägt dazu bei, dass die Dickdarmflora mit fakultativ pathogenen *E. coli*, einem Bakterium, das Teil der physiologischen Dickdarmflora der Taube ist, überwuchert wird. Schließlich kommt es zu einem Übergreifen auf den Dünndarm und zur Überwindung der Darmschranke, was letztlich zu einer Septikämie führt. Die Dysbakterie der Darmflora begünstigt außerdem die Ausbreitung von Parasiten und anderen Sekundärerregern, die letztlich das klinische Bild der Jungtaubenkrankheit prägen.



**Abbildung 7:** Schema zur Pathogenese der Jungtaubenkrankheit, modifiziert nach Freick (2006).

Dass die Pathogenese der Jungtaubenkrankheit, einschließlich der Rolle, die PiCV bei der Entstehung spielt, noch nicht abschließend geklärt ist, machen die Ergebnisse eines Infektionsexperiments von Schmidt *et al.* (2008) deutlich: Mit dem Ziel das klinische Bild der Jungtaubenkrankheit zu reproduzieren, wurden Jungtauben mit PiCV infiziert. Als Stressor, und um den Einfluss einer PiCV-Infektion auf das Immunsystem zu quantifizieren, wurden die Tiere zusätzlich mit einer NDV-Vakzine geimpft. Obwohl es bei allen infizierten Tieren nach der PiCV-Inokulation zu einer Virusreplikation kam, konnten keine klinischen Symptome festgestellt werden. Auch in den NDV-Impftitern unterschieden sich PiCV-infizierte Tauben nicht von der placeboinfizierten und NDV-geimpften Kontrollgruppe. Die Autoren vermuten, dass das Fehlen weiterer Stressoren und die optimalen hygienischen Bedingungen dafür verantwortlich sind, dass die Jungtaubenkrankheit in diesem Versuch nicht reproduziert werden konnte.

### 3 Publikation

#### **Cloning and expression of a truncated pigeon circovirus capsid protein suitable for antibody detection in infected pigeons.**

Iris Daum<sup>1\*</sup>, Tim Finsterbusch<sup>2</sup>, Stefan Härtle<sup>3</sup>, Thomas W. Göbel<sup>3</sup>, Annette Mankertz<sup>2</sup>, Rüdiger Korbel<sup>1</sup>, Christian Grund<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Klinik für Vögel, University of Munich, Munich, Germany

<sup>2</sup>FG12 Division of Viral Infections, Robert-Koch-Institute, Berlin, Germany

<sup>3</sup>Institute for Animal Physiology, University of Munich, Munich, Germany

recombinant PiCV capsid protein as antigen

Manuscript published in Avian Pathology (2009), 2:135 - 141.

([www.informaworld.com](http://www.informaworld.com))

Tel: +49 4721 747 341

Fax: +49 4721 747 161

E-mail: [iris.daum@lah.de](mailto:iris.daum@lah.de)



### 3.1 Abstract

Infections with pigeon circovirus (PiCV, also termed CoCV) occur in meat and racing pigeons (*Columba livia*) of all ages and have been reported worldwide. A PiCV infection is associated with immunosuppression and the development of young pigeon disease syndrom (YPDS). An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of virus-specific serum antibody was developed for research purposes. In the absence of a method to propagate PiCV in cell culture, the assay was based on a recombinant truncated capsid protein (rCapPiCV) produced by over-expression in *Escherichia coli* (*E. coli*). A 6xHis-Tag was fused to the N-terminus of the protein to facilitate purification by metal affinity chromatography and detection by anti-His antibody. PiCV-negative and positive control sera were generated by inoculation of pigeons with tissue homogenate containing PiCV, followed by five weekly blood sample collections. Western Blotting of the immune serum revealed a specific protein band of approximately 32 kDa which was absent in the pre-immune sera. Using rCapPiCV as antigen in an indirect ELISA, PiCV-specific antibody was detected in sera of the experimentally PiCV-infected pigeons collected at one to five weeks post infection. By testing 118 field sera collected in the years 1989, 1991, 1994 and 2008 in the rCapPiCV-ELISA virus-specific antibody was detected in 89 (75 %) of the sera. The results obtained demonstrate that the rCapPiCV-based indirect ELISA is able to detect PiCV-specific antibodies in pigeon sera and may be a useful tool for PiCV-serodiagnosis

### 3.2 Introduction

The first cases of circovirus infection in pigeons (*Columba livia*) have been reported in the United States (Woods *et al.*, 1993; Shivaprasad *et al.*, 1993). Ever since, the agent has been identified in diseased pigeons from South Africa (Gerdes, 1993), Australia, Canada (Woods *et al.*, 1994), the United Kingdom (Smyth & Carroll, 1995), Germany (Soike, 1997), Italy (Coletti *et al.*, 2000), France (Abadie *et al.*, 2001) and the Czech Republic (Taras *et al.*, 2003). Circoviruses are the smallest animal viruses known. They are characterised by a single-stranded circular DNA genome of approximately 2000 nucleotides (nt). The genus *Circovirus* includes the members porcine circovirus type 1 (PCV-1) and type 2 (PCV-2) (Tischer *et al.*, 1982; Mankertz *et al.*, 1997), psittacine beak and feather disease virus (BFDV) (Bassami *et al.*, 1998), pigeon or columbid circovirus (PiCV / CoCV) (Mankertz *et al.*, 2000), goose circovirus (GoCV) (Soike *et al.*, 1999), canary circovirus (CaCV) (Phenix *et al.*, 2001) and the tentative members duck circovirus (DuCV) (Hattermann *et al.*, 2003), finch circovirus (FiCV) (Shivaprasad *et al.*, 2004) and gull circovirus (GuCV) (Twentyman *et al.*, 1999) (Todd *et al.*, 2005). Circoviruses have also been detected in the following avian species, but have not yet been classified as members of the genus *Circovirus*: ostriches (*Struthio camelus*) (Eisenberg *et al.*, 2003), Australian ravens (*Corvus coronoides*) (raven circovirus, RaCV) (Stewart *et al.*, 2006) starlings (*Sturnus vulgaris* and *Sturnus unicolor*) (starling circovirus, StCV) (Johne *et al.*, 2006) and mute swans (*Cygnus olor*) (swan circovirus, SwCV) (Halami *et al.*, 2008). Phylogenetic analysis of avian and mammalian circoviruses and their hosts' cytochrome b indicate a host-specific evolution of circoviruses without virus transmission from distantly related hosts (Johne *et al.*, 2006).

PiCV is characterised by a circular, single-stranded ambisense-organised DNA genome of 2037 nt with five open reading frames (ORFs) (Figure 1a). The putative capsid protein (Cap) is encoded by ORF C1 on the minus strand of PiCV and has a size of 274 amino acids (aa) or 31,9 kDa (pos. 1987 – 1166) (Mankertz *et al.*, 2000). Avian circoviruses show a distinct tropism to lymphoreticular tissue (Johne

*et al.*, 2006), the main signs of infection being immunosuppression and feather disorders (reviewed by Todd 2004). In pigeons, PiCV-specific pathological changes are essentially restricted to primary and secondary lymphatic tissues (Soike *et al.*, 2001), ranging from mild lymphocytic depletion to cystic bursal atrophy with severe lymphoid depletion (Woods *et al.*, 1994; Paré *et al.*, 1999; Coletti *et al.*, 2000; Soike *et al.*, 2001; Raue *et al.*, 2005; Scullion & Scullion, 2007; Schmidt *et al.*, 2008). Therefore it was suggested that PiCV induces a severe immunosuppression in young pigeons, predisposing infected animals to opportunistic secondary infections that would normally be controlled by humoral or cell-mediated immunity (Woods & Shivaprasad, 1997). Subsequently PiCV infection was considered a crucial factor for the development of young pigeon disease syndrome (YPDS), a multifactorial disease characterised by a broad range of unspecific clinical signs including lethargy, anorexia, poor racing performance, weight loss, respiratory distress and diarrhoea (Raue *et al.*, 2005). However, the role of PiCV for the pathogenesis of YPDS remains uncertain as experimental PiCV infection and simultaneous paramyxovirus serotype 1 (APMV-1) vaccination of young pigeons has failed to reproduce YPDS or induce suppression of APMV-1 specific antibody response (Schmidt *et al.*, 2008).

Although PiCV is described to be the most frequently detected infection in young diseased pigeons (Soike *et al.*, 2001), more recent studies demonstrate PiCV infection in apparently healthy adult birds, thus suggesting that many PiCV infections may be subclinical (Paré *et al.*, 1999; Todd *et al.*, 2002; Franciosini *et al.*, 2005; Raue *et al.*, 2005; Duchatel *et al.*, 2006) and persisting, thereby creating a source of infection for younger birds. Still, little is known about the prevalence of infection, especially in adult and newly hatched pigeons (Duchatel *et al.*, 2006). To date, diagnosis of PiCV infection relies on detection of viral DNA by polymerase chain reaction (PCR) (Soike *et al.*, 2001; Todd *et al.*, 2002; Roy *et al.*, 2003; Franciosini *et al.*, 2005; Freick *et al.*, 2008; Todd *et al.*, 2008), dot blot and *in situ* hybridisation (Smyth *et al.*, 2001; Todd *et al.*, 2002) to confirm clinical and histological findings. However, *intra vitam* diagnosis of PiCV is difficult, as testing of blood, tracheal, pharyngeal and cloacal swabs failed to detect all birds found to be infected at necropsy (Franciosini *et al.*, 2005; Duchatel *et al.*, 2006; Todd *et al.*,

---

2006). Therefore, antibody detection is an invaluable tool to evaluate the seroprevalence of PiCV in live wild and captive pigeons, but studies on seroprevalence and antibody response have been hampered by the absence of a culture based virus propagation system. Expression of recombinant capsid protein represents a suitable alternative of antigen production for detection of PiCV-specific serum antibody.

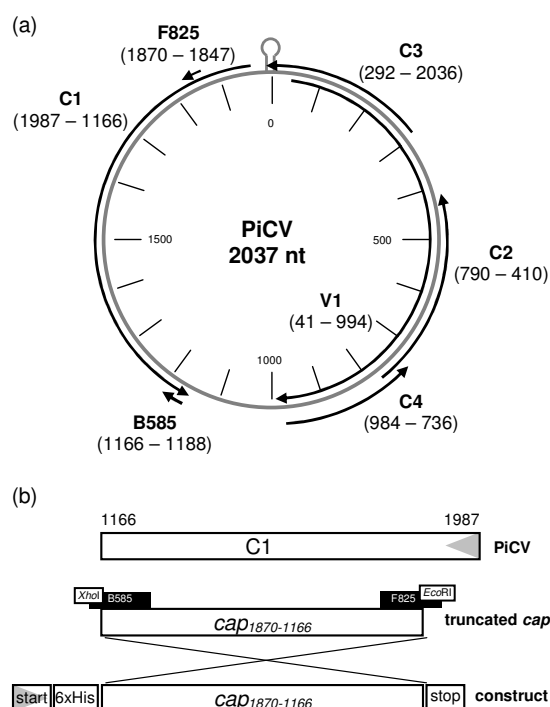
In this study, recombinant expression of a truncated and His-tagged capsid protein of PiCV (rCapPiCV) in *Escherichia coli* (*E. coli*) and its applicability to serological tests is investigated.

### 3.3 Material and Methods

#### Construction of plasmid

All plasmids were constructed by cloning of PCR fragments. For the generation of pTriEx-6HN, oligonucleotides F524 (5'- TCATCATCATCACCATCACAGCAGCGG CGAGCT-3') and B525 (5'-CGCCGCTGCTGTGATGGTGATGATGATGA-3') were hybridised and cloned into the *EcoRV*- and *SacI* restricted vector pTriEx1.1 (Novagen, Darmstadt, Germany) enabling the expression of N-terminally 6xHis-tagged proteins.

For the generation of pTriEx-6HN-*cap*<sub>1870-1166</sub> PCR fragments were amplified with high-fidelity polymerase (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) from a PiCV-isolate (Ger 1, GenBank accession number: AF252610), using primers F825 (5'- CCGAATTCTTACTTCCGCCTACGTCGCAAGGAC-3') and B585 (5'- GTGGCTCGAGTTTATTCAGAATCCACAGCTGAGT-3'). These primers contained engineered *EcoRI* and *XhoI* sites (underlined) to enable insertion of the amplified PCR product into the vector (Figure 1b). PiCV-specific primers were selected on basis of a published PiCV genome (GenBank accession number AF252610; Mankertz *et al.*, 2000) to amplify ORF C1 without the 117 N-terminal nucleotides (pos. 1870 to 1166), due to their high share of arginine codons (Mankertz *et al.*, 2000). The PCR product *cap*<sub>1870-1166</sub> was cloned into an *EcoRI*- and *XhoI* restricted vector pTriEx-6HN. The resulting vector was sequenced to exclude PCR-acquired misincorporations and designated pTriEx-6HN-*cap*<sub>1870-1166</sub>.



**Figure 1 (a):** Genome organisation of PiCV. Black arrows indicate the transcription of potential ORFs of PiCV, being labelled according to their localisation on the virus (V) or the complementary (C) strand. Positions of start and stop codons are given by numbers. The stem-loop element represents the putative origin of replication (Mankertz *et al.*, 2000). Small arrows indicate the position of the primers used to amplify *cap*<sub>1870-1166</sub>. **(b):** Schematic presentation of the construction of pTriEx-6HN-*cap*<sub>1870-1166</sub>, grey triangles indicating direction of transcription. Nt positions are given by numbers. Black boxes represent primers with primer encoded adjacent restriction enzymes, used to amplify *cap*<sub>1870-1166</sub>.

### Transformation of *E. coli* and plasmid preparation

For multiplication, pTriEx-6HN-*cap*<sub>1870-1166</sub> was transformed into One Shot Top10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) in accordance to the manufacturer's protocol. Three single colonies from agar plates were each inoculated in 4 ml medium. All bacteria cultures were incubated at 37°C, liquid cultures on a shaking platform, over night. Luria-Bertani (LB) medium and agar plates (AppliChem, Darmstadt, Germany) supplemented with ampicillin (50 µg/ml)

were used. Plasmids were harvested using the NucleoSpin Plasmid kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturer's user manual. Plasmid concentration was measured photometrically (Eppendorf, Biophotometer, Cologne, Germany).

### **Expression of rCapPiCV in *E. coli***

Bacteria cultures were incubated at 37°C on a shaking platform in LB medium (AppliChem, Darmstadt, Germany).

20 µl competent *E. coli* (RosettaBlue(DE3)LysS) (Novagen, Darmstadt, Germany) were transformed with 10 ng of purified pTriEx-6HN- *cap*<sub>1870-1166</sub> according to the manufacturer's protocol. 2.5 µl transformed cells were diluted in 100 ml LB-Amp-Cam-Glc medium containing 1 % Glucose, 50 µg/ml ampicillin and 34 µg/ml chloramphenicol. The overnight culture was diluted 1:20 in 2 l LB-Amp-Cam-Glc and grown to an optical density (OD) (600 nm) of 0.6. Protein expression was induced by 1 mM isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) (Novagen, Darmstadt, Germany). For analysis of protein expression 500 µl aliquots before, and every 60 minutes (min) after IPTG-induction, were centrifuged (16 100 x g, 1 min, 4°C) and the cell pellets stored at -20°C. After 5 hours, cells were harvested by centrifugation (3000 x g, 10 min, 4°C). Additionally, 300 ml of transformed RosettaBlue(DE3)LysS were grown to an OD of 0.6 without induction by IPTG, lysed by sonication on ice and stored at -20°C.

### **Purification of rCapPiCV**

All purification steps were performed at room temperature. The cells were lysed by incubation in 5 ml buffer B+ (100 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM TrisCl, 8 M Urea, 15 mM Imidazole, pH 8.0) per g wet cell pellet for 60 min on a rotary shaker. The lysate was cleared by centrifugation at 1000 x g for 30 min, and the supernatant used for purification of His-tagged proteins by metal affinity chromatography. Ni-nitrilotriacetic acid agarose beads (Ni-NTA-Agarose) (Qiagen, Hilden, Germany) and the cleared lysate (v/v 5:1) were incubated on a rotary shaker for 60 min. The lysate-resin mixture was loaded to a 20 ml column and washed with 1 ml buffer C (100 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM TrisCl, 8 M Urea, pH 6.3) per ml lysate.

Proteins were eluted in two pH steps, using 1 ml / 2 ml lysate of buffers D and E (100 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM TrisCl, 8 M Urea, pH 5.9 and 4.5 respectively, buffer E containing 250 mM imidazole). 30 µl aliquots of lysis and purification steps were stored at -20°C. Based on sodium dodecyl sulphate-polyacrylamid gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis fractions of high protein concentration were pooled (E<sub>L</sub>) and the total protein amount quantified by 2-D Quant Kit protein assay (Amersham Pharmacia, Freiburg, Germany).

### **SDS-PAGE and Western Blot**

Proteins were separated by 12 % SDS-PAGE under denaturing conditions, following standard procedures (Laemmli, 1970). As protein standards the molecular weight marker Page Ruler (Fermentas, St.Leon-Rot, Germany) for SDS-PAGE and the prestained markers Prestained Protein-Marker (Peglab GmbH, Erlangen, Germany) and Prestained Page Ruler (Fermentas, St.Leon-Rot, Germany) for immunoblotting were used. Proteins were stained with Coomassie Brilliant Blue. For Western Blot analysis proteins were transferred to nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences, Freiburg, Germany) by semi-dry blotting. The membranes were blocked with blocking buffer (2 % w/v skim milk powder in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) supplemented with 0.1 Tween 20 (PBS-T)) for one hour, followed by 3 washings with PBS-T. For analysis of individual sera, the membrane was cut into strips. All incubations were performed on a rocking platform and followed by 3 washings with PBS-T. The His-tag was detected using a monoclonal anti-His mouse antibody (Penta-His Antibody, Qiagen, Hilden, Germany) diluted 1:2,000 in blocking buffer incubated at 4°C overnight, followed by a horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse immune globulin (Ig)-specific polyclonal antibody (goat anti-mouse-IgG-HRP, Sigma, Munich, Germany) diluted 1:1,000 in blocking buffer incubated for 30 min at room temperature. Pigeon sera were diluted 1:250 in blocking buffer and incubated at 4°C followed by a rabbit-derived pigeon IgG-specific antiserum (rabbit anti-pigeon-IgG) (Grund *et al.*, 2001) diluted 1:1,000 in blocking buffer and a HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG specific antibody (anti-rabbit-IgG-HRP) (Sigma, Munich, Germany) diluted 1:10,000 in blocking buffer. All incubations were performed on a rocking platform and followed by 3 washings with PBS-T.



Antigen conjugated to HRP-labelled antibodies was visualised by autoradiography on medical X-ray film (Agfa Curix HT 1.000 G+) using a HRP-substrate (ECL Plus, Amersham Biosciences, Freiburg, Germany) according to the manufacturer's protocol. Randomly selected immune sera were incubated with the lysed uninduced host cell culture for 60 min at room temperature and then processed as described above. The reactivity of those sera was compared with and without pre-incubation with lysed host cells.

## ELISA

To determine the optimal antigen concentration and serum dilution, different rCapPiCV concentrations (5, 10, 20 and 40 µg/ml) were tested against two-fold serial dilutions of pigeon serum tested positive for PiCV antibodies in Western Blot. Subsequently, optimal antigen concentration and sera dilution (10 µg/ml and 1:50 respectively) were used.

The ELISA was performed in Polysorb Immuno Plates (Nunc, Wiesbaden, Germany). To permit binding of the antigen, plates were incubated over night at room temperature with 50 µl/well purified rCapPiCV diluted in bicarbonate buffer (0.05 M bicarbonate in ddH<sub>2</sub>O, pH 9.6). Plates were washed 3 times in washing buffer (PBS plus 0.025 % Tween 20) and blocked for 60 min with 100 µl/well blocking buffer (2 % w/v skim milk powder in washing buffer) followed by 3 washing steps. Sera were diluted in blocking buffer and 50 µl/well was transferred in duplicate to the antigen-coated wells. After an 30 min incubation and 3 subsequent washing steps, 50 µl of rabbit-derived pigeon IgG-specific antiserum (rabbit anti-pigeon-IgG) (Grund *et al.*, 2001) diluted 1:50 in blocking buffer was added to each well and incubated for 30 min. Plates were then washed 3 times and incubated for 30 min with a HRP-labelled goat derived anti-rabbit IgG antibody (anti-rabbit-IgG-HRP) (Sigma, Munich, Germany) diluted 1:500 in blocking buffer. Colour development was accomplished by adding 100 µl/well o-phenylenediamine hydrochloride (1 % w/v) dissolved in citrate buffer plus hydrogen peroxide (0,05 M Na-Citrate in ddH<sub>2</sub>O, pH 4 + 0,15 % v/v H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). After 10 min incubation in darkness, the reaction was stopped by adding 50 µl/well 2 M sulphuric acid in ddH<sub>2</sub>O. Optical densities were measured with an automated plate

spectrophotometer (MR 5000 Dynatech Laboratories) using a test filter with an absorbance wavelength of 490 nm with a reference wave length of 650 nm. Positive reactions were defined as reactions resulting in a mean optical density higher than the mean extinction plus the three-fold standard deviation of all pre-immune sera. For titration the sera were diluted in blocking buffer starting at a dilution of 1:50 followed by 2-fold serial dilution steps. To allow for background noise two wells per plate were not incubated with sera, but only blocking buffer and then processed as described above. To express reactivity of field sera, OD values of the test sera were normalized by subtracting the OD value of the negative control serum and subsequently the ratio of reactivity of individual serum compared to the positive control serum was calculated (S/P-ratio):

$$S/P = \frac{(\text{OD test serum} - \text{OD negative control serumpool})}{(\text{OD positive control serum} - \text{OD negative control serumpool})}$$

## PCR

DNA was prepared using DNAeasy tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany) in accordance to the manufacturer's instructions. Isolated DNA was tested for the presence of PiCV DNA amplifying a 336 nt product within ORF C1 by nested PCR applying the protocol described by Soike *et al.* (2001). Amplificates were separated by gel electrophoresis (2 % agarose) and stained with ethidium bromide.

## Experimental infection of Pigeons with PiCV

Experiments were done according to the German animal welfare regulations and authorized by the Regierung von Oberbayern (AZ.: 209.1/211-2531-63/04). Lymphoid tissue (bursa of Fabricius, spleen, bone marrow) of two pigeons tested positive for PiCV by PCR was homogenised and diluted 1:10 in Minimum Essential Medium (Eagle) (MEM) (Biochrom, Berlin, Germany). For further analysis 100 µl were removed and the remainder was sterile filtrated (0.45 µm) and stored at -80° C. 50 µl of each was cultivated on chicken embryo fibroblasts (CEF) and chicken embryo liver cells (CEL). After 3 subsequent weekly passages the homogenate was determined to be free of CEF- and CEL-culturable pathogens. The source of the birds used for this trial is a pigeon herpesvirus 1 (PHV-1)-free

flock of pigeons housed under SPF-conditions at the Klinik für Vögel (Messana *et al.*, 1997) (LMU Munich, Germany), which was regularly tested for PiCV, PHV-1, APMV-1, *Salmonella spp.* and *Chlamydophila spp.* The flock had never tested positive for any of those pathogens. The pigeons were housed under positive pressure and fed sterilised feed. Personnel leave and enter the facility through an air lock and changing room. Of that flock, 30 pigeons between 4 and 8 weeks of age were selected, randomly divided in two groups and housed separately in a quarantine ward. The quarantine ward included negative pressure, air lock and personnel changing rooms. After one week of acclimatisation, one group was injected 0.5 ml PiCV-containing MEM intramuscularly (*Musculus pectoralis profundus*) and the control group was mock-infected with MEM. Serum samples were collected (*Vena ulnaris*) prior to inoculation followed by weekly sample collection. Blood samples were centrifuged and the sera stored at -20° C. In the infected group, 5, 2 and 8 pigeons were submitted for necropsy at 3, 4 and 5 weeks respectively. All control birds were post mortemed after 5 weeks. Neither infected nor control birds showed any signs of disease. Lymphatic tissues were collected aseptically and immediately stored at -80° C. PiCV-PCR detected PiCV-DNA in all infected but in none of the control birds.

### Field sera

118 pigeon serum samples were tested for PiCV-specific antibodies by ELISA. Pre-immune and immune sera of the experimentally PiCV-infected pigeons served as negative and positive controls. 81 sera were diagnostic samples of former patients of the Klinik für Vögel (LMU, Munich, Germany). Of those, 23 sera were collected in 1989, 38 sera in 1991 and 20 in 1994. The samples from 1989 and 1991 include sera from wild, racing and fancy pigeons, the samples from 1994 originate from wild pigeons only. The samples were stored at -20° C. Additionally, serum samples of a breeding flock, whose offspring was tested PiCV-positive by PCR (Todd *et al.*, 2006) 6 months before, were collected and tested for PiCV-specific serum antibody by ELISA. The flock consists of 37 meat pigeons housed in two stables with 17 and 20 pigeons each. No pigeons had been added to the flock for several years. The offspring had been removed after the PiCV infection was diagnosed. Neither adult pigeons nor offspring had shown signs of disease.

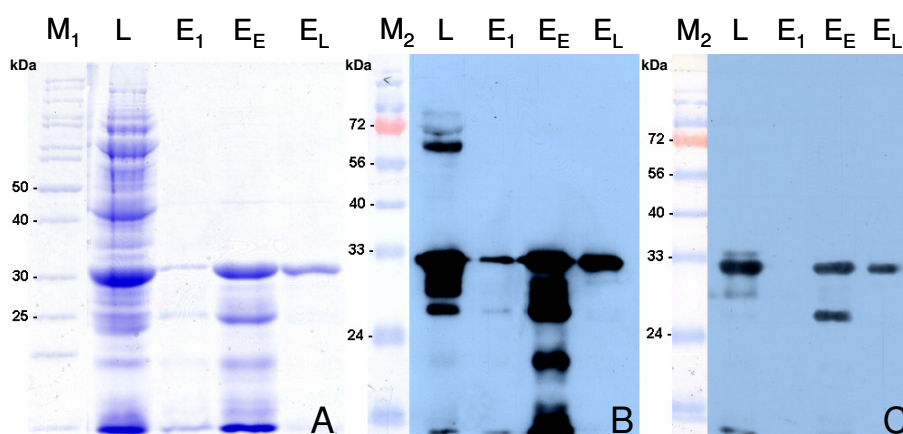
### 3.4 Results

#### Cloning and bacterial expression of a truncated PiCV capsid protein.

The correct construction of the plasmid was confirmed by sequencing. A plasmid expressing aa 40-274 of the PiCV Cap protein was generated. In vitro expression and purification of rCapPiCV in *E. coli* and subsequent SDS-PAGE revealed a highly purified protein with an apparent molecular weight of 32 kDa eluted at pH 4.5 (Figure 2A). A protein concentration of 0.506 mg/ml was determined for the pooled elution fraction E<sub>L</sub>.

#### Antigenicity of rCapPiCV

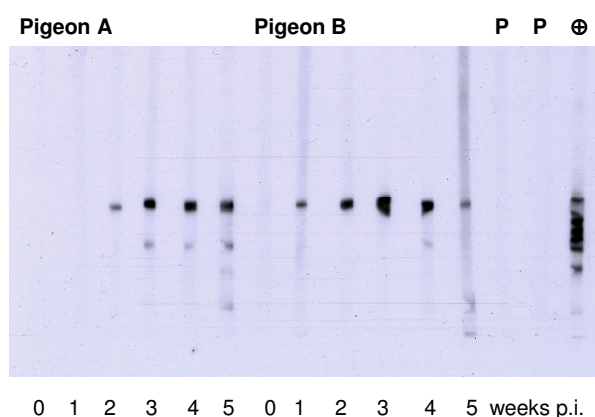
Since antisera against PiCV are not yet available, an anti-His antibody, pre-immune and immune sera of experimentally infected pigeons were used to assess antigenicity of rCapPiCV. In Western Blot analysis a specific protein band of the expected size was detected by the anti-His antibody and the immune serum (Figure 2 B and C), but not by the pre-immune serum (data not shown).



**Figure 2** Protein expression and purification of rCapPiCV. Level of rCapPiCV expression and purification steps were analysed by Coomassie staining (A) and Western Blot analysis using either an anti-His antibody (B) or sera of experimentally PiCV-infected pigeons (C). L: cleared lysate; E<sub>1</sub>: elution at pH 5.9; E<sub>E</sub>: early elution fractions pH 4.5; E<sub>L</sub>: late elution fractions pH 4.5; M<sub>1</sub> and M<sub>2</sub>: protein markers, respective molecular weights are given by numbers.

### Testing of bird sera using purified rCapPiCV by Western Blotting

The purified rCapPiCV (E<sub>L</sub>) was used to detect PiCV-specific serum-antibodies by Western Blot analysis in sera of experimentally PiCV-infected pigeons. In Western Blot analysis a specific band of approximately 32 kDa was detected in sera from 12 of the 15 infected pigeons 1 week post infection (p.i.) and by sera from 14 pigeons 2 weeks p.i. By the third week p.i. all pigeons had detectable amounts of PiCV-antibodies. The anti-His antibody detected several additional bands of lower molecular weight. This effect was rarely seen in pigeon sera and only at least 3 weeks p.i. No PiCV-specific antibodies were detected in pre-immune or control group sera. Pre-incubation of immune sera with lysed uninduced host cell culture did not reduce their reactivity and thereby confirms the absence of interfering *E. coli* proteins. Cross-reactivity with BFDV-antibodies, using sera of two psittacine birds positive for BFDV-antibodies by haemagglutination inhibition test (HI), was not observed (Figure 3).

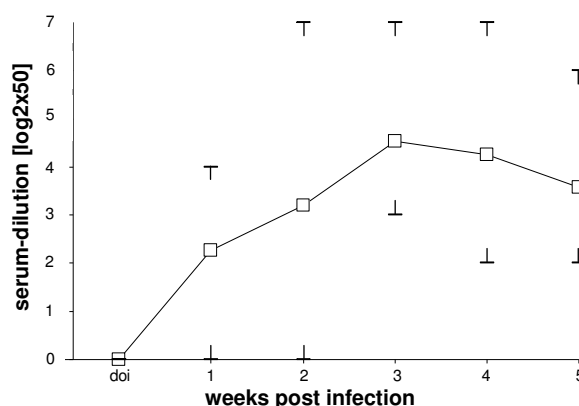


**Figure 3** PiCV-specific reactivity of pigeon sera using purified rCapPiCV (EL) in Western Blot analysis. Sera of two pigeons at different time points after PiCV infection; in addition two psittacine birds infected with BFDV were tested (P). As positive control the anti-His antibody was included (⊕). Reactivity is shown after an exposure time of 10 sec; p.i.: post infection.

### Reaction of bird sera in ELISA

We next analysed the applicability of rCapPiCV in an indirect ELISA system. Pre-immune and immune sera of 15 experimentally infected pigeons were titrated

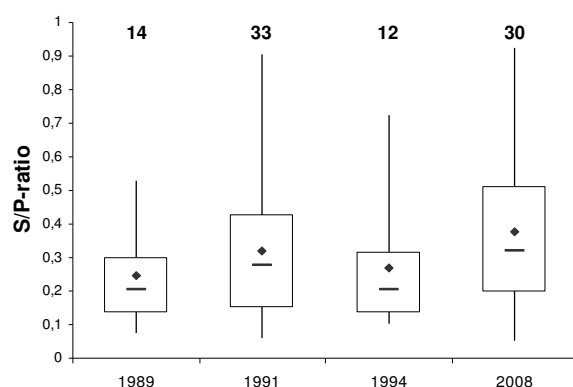
within this test system. The reactivity of the pre-immune sera did not exceed the background noise of rCapPiCV-coated, but not serum-incubated wells. However, one week p.i. 12 pigeons had seroconverted and showed titres ranging from 1:50 to 1:400. Analysis of all time points revealed a rise in titres to the 3rd week p.i., (ranging from 1:200 to 1:3200) and then a slight decline on the fourth and fifth week (titres ranging from 1:100 to 1:3200 and 1:100 to 1:1600 respectively). Mean, individual minimal and maximal titres at each time point are shown in Figure 4.



**Figure 4** ELISA analysis of experimentally PiCV infected pigeons. 15 pigeons were infected with PiCV-positive tissue homogenate followed by weekly bleeding. Mean ( $\square$ ), individual minimal and maximal titres ( $\perp$   $\top$ ) are expressed as log<sub>2</sub>x50; doi: day of infection

### Field sera

In addition to sera from experimentally infected pigeons, pigeon field sera were tested in the PiCV ELISA. Of 118 sera 89 tested positive for PiCV antibodies, ranging in reactivity between moderate to distinct (Figure 5). Of the sera from pigeons collected during the years 1989 and 1991 14 of 23 sera (61 %) and 33 of 38 (87 %) respectively tested positive for PiCV antibodies. Of the sera from feral pigeons collected in 1994 12 of 20 sera (60 %) tested positive. In the serum samples from the breeding flock, collected in 2008, PiCV-antibodies could be detected in 30 of 37 samples (81 %).



**Figure 5:** Detection of PiCV-specific antibodies in pigeon field sera by rCapPiCV-ELISA. A total of 118 sera from 4 different years were tested. The years and the number of positive sera are given by numbers. Reactivity of the sera was standardized as S/P ratio like described in Material in Methods and the Box Plot is showing the median (bold line), the average (♦), the lower and upper hinge (25 % and 75 % respectively) of the PiCV ELISA positive sera.

### 3.5 Discussion

Pigeon circovirus is the most frequently detected infection in diseased young pigeons (Soike *et al.*, 2001) and has been identified throughout the world in meat and racing pigeons of all ages (reviewed by Todd, 2004). The control of PiCV-induced disease is challenging since (i) pigeons are regularly traded, transported and raced, (ii) wild pigeons host a virus reservoir, and (iii) reliable *ante mortem* diagnosis is not available. Antibody detection is a necessary tool for disease control, especially as subclinically infected birds shed virus (Franciosi *et al.*, 2005; Duchatel, *et al.*, 2006; Todd *et al.*, 2006). Detection of antibodies against PiCV indicates that, even if no viral antigen can be detected in swabs, the bird nonetheless had contact with the infectious agent. Therefore a suitable serological test, such as the rCapPiCV based indirect ELISA can help to determine a more accurate PiCV infection rate of pigeon populations compared to use of PCR alone. This offers the possibility of systematic surveillance of flocks and wild pigeons. However, the development of diagnostic methods and vaccines is restrained by PiCV not being cultivable in conventional virus propagation systems. Therefore, a recombinant antigen presents a suitable alternative. As Cap is considered the capsid protein of PiCV, it is likely to induce measurable antibody response in circovirus infected pigeons, as has been shown for the Cap of BFDV in psittacine birds (Johne *et al.*, 2004), GoCV in geese (Scott *et al.*, 2006) and PCV-2 in swine (Nawagitgul *et al.*, 2002). As production of recombinant proteins is a fast and efficient method to produce large amounts of antigen which does not require handling of infected tissues, this approach would present the best method to detect PiCV-specific antibodies, assessing the individual PiCV status as well as for epidemiological surveys.

In this study we investigated the potential of a truncated recombinant Cap of PiCV to detect PiCV-specific serum antibodies. Due to the high proportion of the arginine codons AGG and AGA, which are rarely used in *E. coli*, the first 39 aa were not included into the recombinant Cap. But, if the amino-terminus is involved in packaging of viral DNA into the capsid, and thus located within the capsid, as it has been proposed for corresponding regions within the capsid proteins of chicken



anaemia virus (CAV), the porcine circoviruses (Todd *et al.*, 2005) and BFDV (Heath *et al.*, 2006), the deletion of the region should not reduce the antigenic potential of rCapPiCV. The truncated Cap was expressed in sufficient amounts in *E. coli* and purified to a high degree using nickel affinity chromatography. A protein band was detected not only by anti-His antiserum but also by sera of experimentally PiCV-infected pigeons. Its apparent size of 32 kDa corresponded to the mass calculated for rCapPiCV. The value of rCapPiCV as antigen for detection of PiCV-specific antibodies was confirmed by ELISA and Western Blot analysis, demonstrating seroconversion in all 15 experimentally infected pigeons. Additional bands of lower molecular weight were detected by the anti-His antibody, but only by few of the pigeon sera and considered to be fragments of rCapPiCV containing the His-tag and of minor antigenic relevance. Correlation between ELISA and Western Blot results was 100 %. The fact that 12 pigeons reacted with measurable antibody production to PiCV infection as early as 1 week p.i. might have been due to a cross-reactivity of IgY and IgM light chain. Another possible explanation could be that the flock had been exposed to PiCV prior to the animal trial and the experimental PiCV infection acted as a booster to antibody production. However no antibodies could be detected in the pre-immune sera and no PiCV-DNA could be detected in lymphatic tissue of any of the control birds. As the PCR used is based on the ORF C1, where a certain nucleotide diversity between different PiCV isolates exists (Todd *et al.*, 2008), it has to be taken into account that more distantly PiCV strains might have escaped detection. Nevertheless, the data from the infection experiment clearly demonstrate, that rCapPiCV is a suitable antigen for detection of PiCV-specific antibodies and represents epitopes of the native Cap of PiCV. Since sequence comparisons of 12 different PiCV isolates revealed aa variability within the Cap, antigenic differences may interfere with the overall ability to recognise an infection with a certain PiCV strain (Todd *et al.*, 2008). Testing of field sera in the PiCV-ELISA indicated a broad diagnostic sensitivity, detecting seropositive pigeons in all examined groups. However, putative antigenic differences of PiCV strains have to be addressed in further studies.

Regarding the serological data from field sera it was remarkable that PiCV-antibodies were present in sera from the years 1989, 1991 and 1994, suggesting

that the virus has circulated in German pigeon populations before it was first detected in Germany in 1997 (Soike, 1997). In addition the detection of PiCV-specific antibodies in sera from a breeding flock infected with PiCV, indicates that PiCV-serology could be useful to assess the PiCV status of pigeon flocks. But it has to be taken into account that the ELISA described here has to be validated further. Before it can be applied in routine diagnosis a larger number of defined sera from different sources has to be tested. Cross-reactivity between anti-BFDV antibody and rCapPiCV was not observed, corresponding with results of Woods *et al.* (1993). Moreover, the ability of rCapPiCV to induce a protective immune response against PiCV infection in young pigeons awaits further investigation. In swine, a vaccine containing recombinant PCV-2-Cap protects against PCV-2-challenge, completely inhibiting virus replication (Blanchard *et al.*, 2003).

The rCapPiCV presented in this study provides the opportunity to test for PiCV-specific antibody. This tool can be used in further studies to investigate whether there is a correlation between antibody titre, virus shedding and manifestation of disease. These data is necessary for a correct interpretation of serological results and the development of diagnostic strategies. For example, in BFDV-infection it is proposed that high antibody titres are an indicator for recent infection and no virus shedding, while chronically diseased birds do not have detectable titres but shed virus (Khalesie *et al.*, 2005). Subsequently the combination of virus and antibody detection can provide useful information on the PiCV status of individuals and flocks. In addition studying antibody response in PiCV infected animals will provide an insight into PiCV epidemiology.

### **Acknowledgement**

We thank Beate Köhler (Klinik für Vögel, LMU Munich, Germany) for providing the BFDV-HI positive parrot sera.

### 3.6 References

- Abadie, J., Nguyen, F., Groizeleau, C., Amenna, N., Fernandez, B., Guereaud, C., Guigand, L., Robart, P., Lefebvre, B., & Wyers, M. (2001). Pigeon circovirus infection: pathological observations and suggested pathogenesis. *Avian Pathology*, 30:149-158.
- Bassami, M.R., Berryman, D., Wilcox, G.E., & Raidal, S.R. (1998). Psittacine beak and feather disease virus nucleotide sequence analysis and its relationship to porcine circovirus, plant circoviruses, and chicken anaemia virus. *Virology*, 249:453-459.
- Blanchard, P., Mahé, D., Cariolet, R., Keranflec'h, A., Baudouard, M.A., Cordioli, P., Albina, E., & Jestin, A. (2003). Protection of swine against post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) by porcine circovirus type 2 (PCV2) proteins. *Vaccine*, 21:4565-4575.
- Coletti, M., Franciosini, M.P., Asdrubali, G., & Passamonti, F. (2000). Atrophy of the primary lymphoid organs of meat pigeons in Italy associated with circoviruslike particles in the bursa of Fabricius. *Avian Diseases*, 44:454-459.
- Duchatel, J.P., Todd, D., Smyth, J.A., Bustin, J.C., & Vindevogel, H. (2006). Observations on detection, excretion and transmission of pigeon circovirus in adult, young and embryonic pigeons. *Avian Pathology*, 35:30-34.
- Eisenberg, S.W., van Asten, A.J., van Ederen, A.M., & Dorrestein, G.M. (2003). Detection of circovirus with a polymerase chain reaction in the ostrich (*Struthio camelus*) on a farm in The Netherlands. *Veterinary Microbiology*, 95:27-38.
- Franciosini, M.P., Fringuelli, E., Tarhuni, O., Guelfi, G., Todd, D., Casagrande, P.P., Falocci, N., & Asdrubali, G. (2005). Development of a polymerase chain reaction-based in vivo method in the diagnosis of subclinical pigeon circovirus infection. *Avian Diseases*, 49:340-343.
- Freick, M., Müller, H., & Raue, R. (2008). Rapid detection of pigeon herpesvirus, fowl adenovirus and pigeon circovirus in young racing pigeons by multiplex PCR. *Journal of Virological Methods*, 148:226-231.

- Gerdes, G.H. (1993). Two very small viruses - a presumptive identification. *Journal of the South African Veterinary Association*, 64:2.
- Grund, C., Gerbermann, H., & Grimm, F. (2001). Prevalence of subclinical paramyxovirus infections in parrots in Germany: investigations of droppings and sera [abstract]. In *Proceedings of the 6th European Association of Avian Veterinarians Conference*, (p. 208-211). Munich, Germany.
- Halami, M.Y., Nieper, H., Müller, H., & Johne, R. (2008). Detection of a novel circovirus in mute swans (*Cygnus olor*) by using nested broad-spectrum PCR. *Virus Research*, 132:208-212.
- Hattermann, K., Schmitt, C., Soike, D., & Mankertz, A. (2003). Cloning and sequencing of Duck circovirus (DuCV). *Archives of Virology*, 148:2471-2480.
- Heath, L., Williamson, A.L., & Rybicki, E.P. (2006). The capsid protein of beak and feather disease virus binds to the viral DNA and is responsible for transporting the replication-associated protein into the nucleus. *Journal of Virology*, 80:7219-7225.
- Johne, R., Raue, R., Grund, C., Kaleta, E.F., & Müller, H. (2004). Recombinant expression of a truncated capsid protein of beak and feather disease virus and its application in serological tests. *Avian Pathology*, 33:328-336.
- Johne, R., Fernandez-de-Luco, D., Hofle, U., & Müller, H. (2006). Genome of a novel circovirus of starlings, amplified by multiply primed rolling-circle amplification. *Journal of General Virology*, 87:1189-1195.
- Khalesi, B., Bonne, N., Stewart, M., Sharp, M., & Raidal, S. (2005). A comparison of haemagglutination, haemagglutination inhibition and PCR for the detection of psittacine beak and feather disease virus infection and a comparison of isolates obtained from lorriids. *Journal of General Virology*, 86:3039-3046.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Mankertz, A., Persson, F., Mankertz, J., Blaess, G., & Buhk, H.J. (1997). Mapping and characterization of the origin of DNA replication of porcine circovirus. *Journal of Virology*, 71:2562-2566.

- Mankertz, A., Hattermann, K., Ehlers, B., & Soike, D. (2000). Cloning and sequencing of columbid circovirus (CoCV), a new circovirus from pigeons. *Archives of Virology*, 145:2469-2479.
- Messana, M., Kösters, J., & Grund, C. (1997). Studies on reactivation and transmission of pigeon herpes virus (PHV) for raising PHV-free pigeons (*Columba livia dom.*). *Avian Pathology*, 26:859-864.
- Nawagitgul, P., Harms, P.A., Morozov, I., Thacker, B.J., Sorden, S.D., Lekcharoensuk, C., & Paul, P.S. (2002). Modified indirect porcine circovirus (PCV) type 2-based and recombinant capsid protein (ORF2)-based enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to PCV. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 9:33-40.
- Paré, J.A., Brash, M.L., Hunter, D.B., & Hampson, R.J. (1999). Observations on pigeon circovirus infection in Ontario. *The Canadian Veterinary Journal*, 40:659-662.
- Phenix, K.V., Weston, J.H., Ypelaar, I., Lavazza, A., Smyth, J.A., Todd, D., Wilcox, G.E., & Raidal, S.R. (2001). Nucleotide sequence analysis of a novel circovirus of canaries and its relationship to other members of the genus *Circovirus* of the family *Circoviridae*. *Journal of General Virology*, 82:2805-2809.
- Raue, R., Schmidt, V., Freick, M., Reinhardt, B., Johne, R., Kamphausen, L., Kaleta, E.F., Müller, H., & Krautwald-Junghanns, M.E. (2005). A disease complex associated with pigeon circovirus infection, young pigeon disease syndrome. *Avian Pathology*, 34:418-425.
- Roy, P., Dhillon, A.S., Lauerman, L., & Shivaprasad, H.L. (2003). Detection of pigeon circovirus by polymerase chain reaction. *Avian Diseases*, 47:218-222.
- Schmidt, V., Schlömer, J., Lüken, C., Johne, R., Biere, B., Müller, H., & Krautwald-Junghanns, M.-E. (2008). Experimental Infection of Domestic Pigeons with Pigeon Circovirus. *Avian Diseases*, 52:380-386.
- Scott, A.N.J., Beckett, A., Smyth, J.A., Ball, N.W., Palya, V., & Todd, D. (2006). Serological diagnosis of goose circovirus infections. *Avian Pathology*, 35:495-499.

- Scullion, F.T., & Scullion, M.G. (2007). Pathologic findings in racing pigeons (*Columba livia domestica*) with "young bird sickness". *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 21:1-7.
- Shivaprasad, H.L., Chin, R.P., Jeffrey, J.S., Nordhausen, R.W., & Latimer, K.S. (1993). A new viral disease of pigeons? Particles resembling circovirus in the bursa of fabricius [abstract]. In *Proceedings of the 42. Western Poultry Disease Conference*. (p. 99-100). Sacramento, California, USA.
- Shivaprasad, H.L., Hill, D., Todd, D., & Smyth, J.A. (2004). Circovirus infection in a Gouldian finch (*Chloebia gouldiae*). *Avian Pathology*, 33:525-529.
- Smyth, J.A., & Carroll, B.P. (1995). Circovirus infection in European racing pigeons. *Veterinary Record*, 136:173-174.
- Smyth, J.A., Weston, J., Moffett, D.A., & Todd, D. (2001). Detection of circovirus infection in pigeons by in situ hybridization using cloned DNA probes. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 13:475-482.
- Soike, D. (1997). [Circovirus infections in pigeons]. *Tierärztliche Praxis*, 25:52-54.
- Soike, D., Köhler, B., & Albrecht, K. (1999). A circovirus-like infection in geese related to a runting syndrome. *Avian Pathology*, 28:199-202.
- Soike, D., Hattermann, K., Albrecht, K., Segalés, J., Domingo, M., Schmitt, C., & Mankertz, A. (2001). A diagnostic study on columbid circovirus infection. *Avian Pathology*, 30:605-611.
- Stewart, M.E., Perry, R., & Raidal, S.R. (2006). Identification of a novel circovirus in Australian ravens (*Corvus coronoides*) with feather disease. *Avian Pathology*, 35:86-92.
- Taras, L., Kubicek, O., Juranova, R., & Jurajda, V. (2003). The first demonstration of pigeon circovirus infection in the Czech Republic based on histology and nested PCR. *Acta Veterinaria Brno*, 72:577-582.
- Tischer, I., Gelderblom, H., Vettermann, W., & Koch, M.A. (1982). A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature*, 295:64-66.

- Todd, D., Duchatel, J.P., Weston, J.H., Ball, N.W., Borghmans, B.J., Moffett, D.A., & Smyth, J.A. (2002). Evaluation of polymerase chain reaction and dot blot hybridisation tests in the diagnosis of pigeon circovirus infections. *Veterinary Microbiology*, 89:1-16.
- Todd, D. (2004). Avian circovirus diseases: lessons for the study of PMWS. *Veterinary Microbiology* 98:169-174.
- Todd, D., Bendinelli, M., Biagini, P., Hino, S., Mankertz, A., Mishiro, S., Niel, C., Okamoto, H., Raidal, S., Ritchie, B.W. & Teo, G.C. (2005). Family Circoviridae. In Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., & Ball, L.A., (Eds), *Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses, Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses* (p.327 -330). Elsevier Academic Press. San Diego, USA, London UK.
- Todd, D., Duchatel, J.P., Bustin, J.C., Scullion, F.T., Scullion, M.G., Scott, A.N., Curry, A., Ball, N.W., & Smyth, J.A. (2006). Detection of pigeon circovirus in cloacal swabs: implications for diagnosis, epidemiology and control. *Veterinary Record*, 159:314-317.
- Todd, D., Fringuelli, E., Scott, A.N., Borghmans, B.J., Duchatel, J.P., Shivaprasad, H.L., Raidal, S.R., Abadie, J.X., Franciosi, M.P., & Smyth, J.A. (2008). Sequence comparison of pigeon circoviruses. *Research in Veterinary Science*, 84:311-319.
- Twentyman, C.M., Alley, M.R., Meers, J., Cooke, M.M., & Duignan, P.J. (1999). Circovirus-like infection in a southern black-backed gull (*Larus dominicanus*). *Avian Pathology*, 28:513-516.
- Woods, L.W., Latimer, K.S., Barr, B.C., Niagro, F.D., Campagnoli, R.P., Nordhausen, R.W., & Castro, A.E. (1993). Circovirus-like infection in a pigeon. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 5:609-612.
- Woods, L.W., Latimer, K.S., Niagro, F.D., Riddell, C., Crowley, A.M., Anderson, M.L., Daft, B.M., Moore, J.D., Campagnoli, R.P., & Nordhausen, R.W. (1994). A retrospective study of circovirus infection in pigeons: nine cases (1986-1993). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 6:156-164.
- Woods, L.W., & Shivaprasad, H.L. (1997). Pigeon circovirus infection. In Calnek, B.W., Barnes, H.J., Beard, C.W., McDougald, L.G., & Saif, Y.M., (Eds) *Diseases of Poultry* 10<sup>th</sup> edn (pp 1050-1053). Ames: Iowa State University Press.

## 4 Diskussion

Das Taubencircovirus wurde seit seiner Erstbeschreibung 1993 (Woods *et al.*), mit Ausnahme Südamerikas, auf allen Kontinenten und bei Tauben jeden Alters und jeder Nutzungsrichtung nachgewiesen (Gerdes, 1993; Woods *et al.*, 1994; Smyth & Carroll, 1995; Soike, 1997; Coletti *et al.*, 2000; Abadie *et al.*, 2001; Taras *et al.*, 2003). Es ist das bei erkrankten Jungtauben am häufigsten nachgewiesene infektiöse Agens (Soike *et al.*, 2001).

Die Kontrolle der Verbreitung des PiCV gestaltet sich schwierig, da (a) Tauben – auch über Ländergrenzen hinweg – gehandelt, transportiert, geflogen und ausgestellt werden, (b) Wildtauben ein Virusreservoir darstellen könnten, (c) das Virus gegen viele der üblichen Desinfektionsmaßnahmen resistent ist und (d) die *intra vitam*-Untersuchung auf PiCV nur bei positivem Befund beweisend ist.

Der Nachweis von Antikörpern ist ein wichtiges Mittel, um subklinisch und persistent infizierte Tiere, die eine potenzielle Infektionsquelle darstellen, zu erkennen. Die Tatsache, dass zum heutigen Zeitpunkt kein Kulturverfahren für die Vermehrung von PiCV zur Verfügung steht, erschwert die anti-PiCV-Antikörperdetektion, da eine standardisierte Produktion von Antigenen durch klassisch-kulturelle Verfahren nicht möglich ist. Der Einsatz rekombinanter Proteine als Antigene ist eine sinnvolle Alternative, da sie kostengünstig, effizient und standardisierbar in der Herstellung sind und außerdem ohne die Handhabung von infektiösen Geweben auskommen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein rekombinantes PiCV-Kapsidprotein in *E. coli* exprimiert und dessen Potential als Antigen in serologischen Tests untersucht.

### 4.1 Auswahl, Expression und Reinigung des Kapsidproteins von PiCV (rCapPiCV)

Für serologische Untersuchungen im Western Blot und ELISA wurde das Kapsidprotein des PiCV ausgewählt. Von anderen Vertretern der Familie *Circoviridae* ist bekannt, dass die Kapsidproteine aufgrund ihrer exponierten Lage



auf der Virusoberfläche eine humorale Immunantwort auslösen und dass sie sich zum Antikörpernachweis eignen (Nawagitgul *et al.*, 2002; Johne *et al.*, 2004; Scott *et al.*, 2006).

Als Wirtszelle wurde *E. coli* eingesetzt, da Bakterienkulturen in der Regel kostengünstiger und einfacher in der Handhabung sind als Säuger- und Insektenzellen. Die Verwendung prokaryotischer Wirtszellen zur Expression viraler Proteine von Viren, die ausschließlich in eukaryotischen Zellen replizieren, hat allerdings den Nachteil, dass die zur Proteinexpression eingesetzten transfer (t) RNAs von denen eukaryotischer Zellen abweichen. Besonders große Unterschiede bei den von Viren und Prokaryoten verwendeten Codons gibt es bei der Aminosäure Arginin. Trundova und Celer (2007) konnten zeigen, dass die Expression des Kapsidproteins von PCV-2 nicht in dem *E. coli*-Stamm BL21-(DE3)AI, aber in dem Codon-optimierten BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL möglich ist. Vor diesem Hintergrund wurde der *E. coli*-Stamm RosettaBlue(DE3)LysS gewählt, der zusätzlich über die tRNAs AGG, AGA, AUA, CUA, CCC und GGA verfügt, also Codons, die in *E. coli* natürlicherweise selten verwendet werden. Zusätzlich wurde die *cap*-Sequenz ohne die ersten 5'-terminalen 117 Nukleotide kloniert, da diese einen hohen Anteil an den Arginin-Codons AGG und AGA (Mankertz *et al.* 2000) aufweisen.

Die rekombinanten Proteine wurden nicht in löslicher Form, sondern als inclusion bodies in den Bakterienzellen abgelagert. Die Bildung von inclusion bodies wird durch Fehlfaltung der exprimierten Proteine oder hohe Proteinkonzentrationen hervorgerufen und ist ein bei der Überexpression in *E. coli* häufig beobachtetes Phänomen (Georgiou & Valax, 1996). Durch den Einsatz von 8-molarem Harnstoff in allen zur Aufreinigung verwendeten Puffern gelang es, das Protein in Lösung zu halten.

Durch die Integration eines N-terminalen 6xHistidin-Rest (His-Tag) und eines Stopp-Codons vor dem im Vektor enthaltenen C-terminalen His-Tag konnten mittels Metall-Affinitäts-Chromatographie neben rCapPiCV auch unvollständig exprimierte Proteine aufgereinigt werden. Um die Spezifität der Aufreinigung zu

erhöhen, wurde den Elutionspuffern 250 millimolar Imidazol zugesetzt und die Proteine bei zwei unterschiedlichen pH-Werten eluiert. Die Auftrennung verschiedener Elutionsfraktionen durch Sodeumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und anschließende Färbung mit Coomassie Brilliant Blue zeigte für die späten Elutionsfraktionen bei einem pH-Wert von 4,5 einen sehr hohen Reinheitsgrad. Auf der Basis dieser Ergebnisse wurden hochaufgereinigte Elutionsfraktionen gepoolt und in weiterführenden Untersuchungen eingesetzt. In wiederholten Expressionen konnte rCapPiCV in großen Mengen, durchschnittlich 3 mg pro Liter Expressionsvolumen, gewonnen werden.

Aus diesen Ergebnissen wurden folgende Schlüsse gezogen:

Die verwendeten Verfahren ermöglichen eine effiziente Expression des rCapPiCV und dessen Aufreinigung zu einem hohen Reinheitsgrad. RCapPiCV besitzt bei Expression in *E. coli* nur geringe Löslichkeit.

## 4.2 PiCV-Infektionsexperiment

Da zu Beginn dieser Arbeit kein Testsystem zum Nachweis von anti-PiCV-Antikörpern und damit keine definiert positiven und negativen Seren verfügbar waren, wurden diese mit Hilfe eines PiCV-Infektionsexperiments gewonnen.

Obwohl der Nachweis von PiCV-DNA in lymphatischen Geweben aller inokulierter Tauben die systemische Ausbreitung und Besiedelung der lymphatischen Organe – und damit den Erfolg der experimentellen Infektion – zeigte, kam es über den gesamten Beobachtungszeitraum bei keinem Tier zum Auftreten klinischer Symptome. Das Fehlen klinischer Symptome nach experimenteller PiCV-Infektion wurde auch von Schmidt *et al.* (2008) beobachtet und kann wie folgt interpretiert werden:

- 1) Der hohe Hygienestatus und das Fehlen von Stressoren wie Überbesatz, Hitze und die Jungtaubenreise verhinderten die klinische Manifestation

der PiCV-Infektion (Woods & Shivaprasad 1997; Raue *et al.*, 2005; Scullion & Scullion, 2007; Schmidt *et al.*, 2008).

- 2) Das zur Infektion eingesetzte PiCV-Isolat ist von geringer Pathogenität (Abadie *et al.*, 2001; Freick, 2006) oder wurde in einem zu niedrigen Titer appliziert (Duchatel *et al.*, 2006).
- 3) Das Immunsystem ist bei Tauben in einem Alter zwischen vier und acht Wochen bereits weit genug entwickelt, um die Entstehung der klinischen Symptome einer PiCV-Infektion zu unterbinden (Woods *et al.*, 1994; Shivaprasad *et al.*, 1994; Woods & Shivaprasad, 1997).

Die zugrundeliegende Ursache für das Ausbleiben klinischer Symptome nach experimenteller PiCV-Infektion kann im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. In PCV-2-Infektionsexperimenten bei Schweinen konnte gezeigt werden, dass durch Koinfektionen mit Porcinem Parvovirus, Porcinem Reproductive and Respiratory Virus oder *Mycoplasma hyopneumoniae* Ausmaß und Häufigkeit PCV-2-induzierten Läsionen und klinischer Symptome gesteigert werden konnten (Opriessnig *et al.*, 2007). In Anlehnung an diese Beobachtungen und aufgrund der Tatsache, dass die klinischen Symptome einer PiCV-Infektion von Sekundärerregern beeinflusst werden (Woods & Shivaprasad 1997; Raue *et al.*, 2005; Scullion & Scullion, 2007; Schmidt, 2007), sollten PiCV-Infektionsexperimente zur Reproduktion der Erkrankung zukünftig Koinfektionen mit einbeziehen. Die Beobachtung unterstreicht den Bedarf an weiterer Forschungsarbeit zur Pathogenese und Relevanz der PiCV-Infektion. Auf das eigentliche Ziel des Tierversuchs aber, nämlich die Gewinnung von PiCV-Immunseren, hat sie keinen Einfluss.

### 4.3 Antigenizität und Spezifität

Die Fähigkeit des rCapPiCV spezifische Antikörper zu binden, wurde initial mittels Western Blot-Analyse untersucht. Dafür wurden die Reaktionsmuster eines anti-

His-Antikörpers und der Präimmun- und Immunseren der experimentell PiCV-infizierten Tauben gegen rCapPiCV untersucht.

Die Analyse im Western Blot konnte zeigen, dass eine Protein-Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 32 kDa sowohl durch den anti-His-Antikörper als auch durch die Immunseren der Tauben erkannt wurde. Die Präimmunseren hingegen zeigten keine Reaktivität. RCapPiCV repräsentiert demzufolge – auch nach Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen – Epitope, die durch Antikörper PiCV-infizierter Tauben erkannt werden.

Zusätzlich wurden durch den anti-His-Antikörper Proteinbanden von geringerem Molekulargewicht erkannt. Diese Banden wurden unregelmäßig auch durch Präimmunseren ab drei Wochen p. i. detektiert. Aller Wahrscheinlichkeit nach handelt es sich dabei um unvollständig exprimierte Proteine von untergeordneter immunogener Bedeutung.

Eine Kreuzreaktion mit anti-BFDV-Antikörpern konnte durch die Untersuchung zweier serologisch BFDV-positiver Papageienseren nicht festgestellt werden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Woods *et al.* (1993).

Durch den Vergleich der Reaktivitäten zufällig ausgewählter Immunseren mit und ohne Vorinkubation mit einer nicht-transformierten, lysierten RosettaBlue(DE3)LysS-Kultur, konnte gezeigt werden, dass sich in der Aufreinigung keine für die PiCV-Spezifität relevanten Wirtszellproteine befinden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass (a) eine PiCV-Infektion zur Bildung von Antikörpern gegen das Kapsidprotein führt und (b) rCapPiCV spezifisch sowohl anti-His-Antikörper, als auch native anti-PiCV-Antikörper bindet. Damit gelang erstmalig der Nachweis von anti-PiCV-Antikörpern.

#### **4.4 Indirekter ELISA zum Nachweis von anti-PiCV-Serumantikörpern: Entwicklung**

Um die parallele Untersuchung von einer großen Anzahl an Seren auf anti-PiCV-Antikörper zu ermöglichen, wurde ein indirekter ELISA entwickelt.

Das ELISA-System bietet die Vorteile, dass im Gegensatz zur Western Blot-Analyse ein hoher Probenumsatz möglich ist und die Auswertung objektiviert und automatisiert durchgeführt werden kann.

Da im ELISA nur die Reaktivität der Seren gegen das eingesetzte Antigen an sich – und nicht wie im Western Blot die Reaktivität gegen bestimmte Proteinbanden – bestimmt wird, setzt der ELISA einen hohen Reinheitsgrad des Antigens gegen die zu untersuchenden Antikörper voraus.

Durch wiederholte Schachbrett-Titrations in 96-Loch Mikrotiterplatten wurden die optimale Antigenkonzentration und Serumverdünnung bestimmt. Die ermittelte Antigenkonzentration von 10 µg/ml entspricht der Antigenkonzentration, die für einen in einem vergleichbaren Verfahren entwickelten, indirekten ELISA zum Nachweis von anti-BFDV-Antikörpern bestimmt wurde (Johne *et al.*, 2004). Die hier vorgestellten Verfahren zur Antigengewinnung sind sehr effizient, da pro Liter Kulturvolumen eine Antigenmenge, die zur Untersuchung von ca. 2400 Seren im Doppelansatz ausreicht, hergestellt werden kann.

Der Vergleich der Ergebnisse aller Präimmun- und Immunseren in Western Blot und ELISA zeigte eine Korrelation der beiden Methoden von 100 % und bestätigte damit, dass das gewonnene Protein die Voraussetzungen zur Verwendung als Antigen im ELISA-Format erfüllt.

Durch wiederholte Untersuchung von 45 Seren, die keine, niedrige, mittlere und hohe Reaktivitäten aufwiesen, konnte für alle Seren das Ergebnis der serologischen Untersuchung bestätigt werden. Dadurch konnte gezeigt werden, dass der hier vorgestellte indirekte ELISA reproduzierbare Ergebnisse liefert.

## **4.5 Indirekter ELISA zum Nachweis von anti-PiCV-Serumantikörpern: Anwendung**

Der im Rahmen dieser Arbeit etablierte PiCV-ELISA wurde zur Untersuchung von Taubenseren eingesetzt. Diese Untersuchungen sind in ihrem Umfang zu gering, um einer Validierung des Testsystems zu entsprechen, sollten aber helfen, folgende Fragen zu beantworten:

- 1) Ab welchem Zeitpunkt nach der Inokulation weisen die Tauben aus dem Infektionsexperiment messbare anti-PiCV-Antikörper auf?
- 2) Gibt es in dem durchgeführten Infektionsexperiment einen Zusammenhang zwischen Immunantwort und Verlauf der Infektion?
- 3) Können mit Hilfe des entwickelten ELISA auch Antikörper aus einer Feldinfektion nachgewiesen werden?
- 4) Weisen Taubenseren aus Jahren vor der Erstbeschreibung einer PiCV-Infektion in Deutschland anti-PiCV-Antikörper auf?

### **4.5.1 Serokonversion**

Die Untersuchung der in wöchentlichem Abstand über die Versuchsdauer genommenen Serumproben der PiCV-inokulierten Tauben im rCapPiCV-ELISA zeigte, dass ab der dritten Woche p. i. und bis Versuchsende anti-rCapPiCV-Antikörper in allen 15 PiCV-inokulierten Tauben nachweisbar waren. Zwölf Tauben wiesen bereits eine Woche p. i. messbare anti-PiCV-Antikörper-Spiegel auf. Diese Tatsache ist wahrscheinlich auf eine Kreuzreaktion der leichten Kette des IgY und IgM zurückzuführen. Eine weitere mögliche Ursache ist, dass die verwendeten Tauben vor Versuchsbeginn schon einmal PiCV ausgesetzt waren, und die experimentelle Infektion als Booster auf die Antikörperproduktion gewirkt hat. Aber die Wahrscheinlichkeit, dass die Tauben vor der experimentellen Infektion eine PiCV-Infektion durchgemacht haben, ist aufgrund der Ergebnisse der PiCV-Untersuchung der uninfizierten Kontrolltiere, die für alle Tiere negativ waren,

gering. Dabei muss aber berücksichtigt werden, dass die für den PiCV-Nachweis eingesetzte PCR von Soike *et al.* (2001) auf dem *cap*-Gen eines PiCV-Isolats (Ger 1, accession number: AF252610) basiert, und *cap* nur eine eingeschränkte Homologie innerhalb der PiCV-Isolate aufweist (Todd *et al.*, 2008). Entfernter verwandte PiCV-Isolate können sich also dem Nachweis entziehen. Gegen eine PiCV-Exposition vor Versuchsbeginn spricht außerdem, dass weder die Kontrolltiere, noch die Präimmunseren messbare anti-PiCV-Antikörper aufwiesen.

#### **4.5.2 Korrelation zwischen Immunantwort und Verlauf einer PiCV-Infektion**

Um die Antikörperantwort der Tauben im Verlauf der PiCV-Infektion zu quantifizieren, wurde von allen Immunseren durch Titration ein Antikörpertiter bestimmt. Im Mittel zeigten die Tauben einen Anstieg der Antikörpertiter bis zur 3. Woche p. i. auf über 1:400. Bis zur 5. Woche p. i. kommt es zu einem leichten Abfall der mittleren Antikörpertiter auf 1:200. Bei Betrachtung der Titer-Verläufe der einzelnen Tiere wurde deutlich, dass große individuelle Unterschiede vorliegen, und anhand des Titers allein kein Rückschluss auf die Dauer der Infektion möglich ist.

Bei Versuchsende konnte mittels PCR PiCV-DNA in lymphatischen Organen aller Tauben und damit die systemische Ausbreitung und Replikation des inokulierten Virus nachgewiesen werden. Zusammen mit der Tatsache, dass es bei allen Tauben zu einer Serokonversion kam, zeigen diese Ergebnisse, dass in diesem Modell und über einen Zeitraum von fünf Wochen die gemessene humorale Immunantwort die systemische Ausbreitung des Virus nicht verhindern und das Virus nicht eliminieren kann.

Bei einer Infektion mit BFDV werden bei Papageien mit dem klinischen Bild der Schnabel- und Federkrankheit keine oder niedrige mit dem Hämagglutinations-Hemmungs-Test (HAH) messbare Antikörpertiter gefunden. Dies wird auf die BFDV-induzierte Zerstörung des Immunsystems zurückgeführt. Im Gegensatz dazu scheinen erst seit kurzem infizierte Tiere, deren Immunsystem effektiv reagiert, durch hohe Antikörpertiter, fehlende Virusausscheidung und physiologische Befiederung gekennzeichnet zu sein (Ritchie *et al.*, 1991; Riddoch

*et al.*, 1996; Khalesie *et al.*, 2005). Überträgt man diese Beobachtung auf die Ergebnisse aus dem PiCV-Infektionsexperiment, können das Ausbleiben klinischer Symptome zusammen mit den gemessenen Antikörpertitern als Ausdruck eines effektiv arbeitenden Immunsystems interpretiert werden. Die Untersuchung von Seren klinisch an PiCV-Infektion erkrankter Tauben kann zeigen, ob es auch bei einer PiCV-Infektion mit dem Auftreten klinischer Symptome zu einer Abnahme der virusspezifischen Antikörper kommt.

Der im Rahmen dieser Arbeit etablierte indirekte ELISA ermöglicht erstmals den Nachweis von anti-PiCV-Antikörpern und damit weiterführende Untersuchungen zu diesen Zusammenhängen.

#### **4.5.3 Untersuchung von Seren natürlich infizierter Tauben auf anti-PiCV-Antikörper**

Um zu überprüfen, ob sich der hier vorgestellte ELISA auch zum Nachweis von anti-PiCV-Antikörpern aus einer natürlichen Infektion eignet, wurden Feldseren untersucht. Diesen Untersuchungen lagen folgende Überlegungen bezüglich des Antigens, der nachgewiesenen Antikörper und der Auswahl der Seren zu Grunde:

##### **1) Antigen**

Der PiCV-Nachweis in dem zur Infektion verwendeten Gewebe mittels PCR und der Abschnitt des *cap*, der dem rekombinanten Protein zu Grunde liegt, beruhen auf der Sequenz desselben PiCV-Isolats Ger 1 (accession number: AF252610) das 2000 in Deutschland isoliert und sequenziert wurde (Mankertz *et al.*, 2000). Untersuchungen von Todd *et al.* (2008) zur Sequenzhomologie von Ger 1 und elf weiteren PiCV-Isolaten zeigen, dass die einzelnen PiCV-Isolate im Bereich des Kapsidproteins eine Aminosäurediversität von bis zu 27 % aufweisen. Ob sich die Unterschiede auf Aminosäureebene auf die antigenetischen Eigenschaften der einzelnen PiCV-Isolate auswirken, ist bisher nicht bekannt. Daraus ergibt sich die Frage, ob und wie weit PiCV-Antigene virusstammübergreifend zur Serodiagnostik und Impfung eingesetzt werden können. Um einen Einblick zu bekommen, ob sich Antikörper aus Infektionen mit aktuell in der Taubenpopulation zirkulierende PiCV-Stämmen mit dem



rCapPiCV-ELISA nachweisen lassen, wurden Serumproben von Tauben aus einem Bestand mit nachgewiesener, natürlicher PiCV-Infektion untersucht.

## 2) Antikörper

Der rCapPiCV-ELISA wurde mit Hilfe von Seren aus einem Infektionsexperiment etabliert. Die PiCV-Inokulation der Versuchstauben erfolgte, abweichend vom natürlichen Infektionsweg, per Injektion in die Brustmuskulatur, wodurch möglicherweise eine stärkere Immunreaktion als unter natürlichen Bedingungen erreicht wurde. Zu diesem Zeitpunkt lagen keine Daten über die Antikörperantwort von natürlich PiCV-infizierten Tauben vor. Es konnte also nicht ausgeschlossen werden, dass sich Seren von natürlich PiCV-infizierten Tauben in ihrer Reaktivität gegen rCapPiCV unterscheiden und das ELISA-System an diese Bedingungen angepasst werden muss.

## 3) Auswahl der Taubenserren

Für einen möglichen Einsatz des rCapPiCV-ELISAs in der Routine-PiCV-Diagnostik war die Untersuchung von Seren subklinisch und/oder persistent infizierter Tauben von besonderem Interesse, da sich die *intra-vitam*-Bestimmung des PiCV-Status bei dieser Gruppe am schwierigsten gestaltet und diese Tauben maßgeblich an der Verbreitung des Virus beteiligt sind (Franciosini *et al.*, 2005; Duchatel *et al.*, 2006; Freick, 2006; Todd *et al.*, 2006). Dieses Problem konnten Duchatel *et al.* (2006) durch die Untersuchung von zehn klinisch gesunden Brutpaaren und ihrer Nachzucht anschaulich darstellen: Alle Alttauben waren in Kloakentupferproben, die sieben Tage sowie einen Tag vor der Verpaarung genommen wurden, PiCV-negativ. Bei der Untersuchung der Nachzucht zeigte sich aber, dass am 51. Lebenstag alle Jungtauben PiCV über den Kot ausschieden, also eine Übertragung des Virus von den Alt- auf die Jungtauben stattgefunden hatte.

Unter Einbeziehung dieser Überlegungen wurde ein klinisch gesunder Taubenzuchtbestand (n = 37) zur Untersuchung ausgewählt, in dem sechs Monate zuvor eine PiCV-Feldinfektion in der Nachzucht nachgewiesen wurde. Die

Tatsachen, dass erstens Vollgeschwister aus verschiedenen Bruten PiCV-positiv waren, und zweitens keines der Tiere klinische Krankheitssymptome gezeigt hatte, sprechen für ein im Bestand persistierendes, subklinisches PiCV-Infektionsgeschehen, bei dem das Virus von den Alttauben auf die Nachzucht übertragen wurde.

Um die Reaktivitäten der Feldseren mit denen der Seren der experimentell infizierten Tauben in Bezug zu setzen, wurden, zusätzlich zu den Referenzseren, auf jeder Platte Immunseren mit mittlerer und niedriger Reaktivität eingesetzt. Des Weiteren wurden Antigen, Seren und Konjugate in den über die Referenzseren als optimal ermittelten Verdünnungen bzw. Konzentrationen verwendet.

Die Untersuchung der Serumproben der 37 Alttauben im rCapPiCV-ELISA wies anti-PiCV-Antikörper in 30 von 37 Serumproben nach. Diese Ergebnisse zeigen, dass auch bei natürlicher PiCV-Infektion Antikörper gegen das Kapsidprotein gebildet werden, und dass das mit Hilfe eines Infektionsexperiments etablierte ELISA-System ohne Anpassung auf natürliche Infektionen übertragen werden kann.

Die positiven Seren zeigten – analog zu den Immunseren aus dem PiCV-Infektionsversuch – niedrige, mittlere und hohe Reaktivitäten. Die experimentelle Infektion scheint also, im Bezug auf die Antikörperantwort gegen rCapPiCV, einer natürlichen Infektion zu entsprechen.

Die Detektion von anti-PiCV-Antikörpern in dem untersuchten Taubenbestand beweist, dass sich mit Hilfe serologischer Methoden subklinische PiCV-Infektionsgeschehen nachweisen lassen. Dies ist insbesondere im Hinblick auf eine mögliche Bekämpfung der Ausbreitung des PiCV von Bedeutung.

#### **4.5.4 Untersuchung von Feldseren auf anti-PiCV-Antikörper**

Nach dem erfolgreichen Nachweis des rCapPiCV-ELISAs von anti-PiCV-Antikörpern aus natürlichen Infektionen wurden Taubenserum mit unbekanntem

PiCV-Status aus dem Patientengut der Klinik für Vögel (Ludwig-Maximilians-Universität, München) untersucht.

Es wurden Seren von 1989, 1991 und 1994, also aus Jahren vor der Erstbeschreibung von PiCV in Deutschland 1997 (Soike), ausgewählt, um zu testen, ob Tauben schon vor diesem Zeitpunkt anti-PiCV-Antikörper aufweisen, das Virus also schon früher in der Taubenpopulation zirkuliert haben könnte.

Ein weiteres Auswahlkriterium war die Nutzungsrichtung: Neben Brieftauben ( $n = 26$ ), in denen das Virus bisher am häufigsten nachgewiesen wurde, wurden auch Rasse- ( $n = 15$ ) und Stadtauben ( $n = 25$ ) in die Untersuchung einbezogen.

Von den insgesamt 81 untersuchten Taubenseren konnten in 59 (73 %) der Proben anti-PiCV-Antikörper nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass PiCV-Infektionen schon vor ihrem ersten Nachweis in Deutschland auftraten. Die Tatsache, dass der überwiegende Anteil der Seren anti-PiCV-Antikörper aufwies, deutet darauf hin, dass die Infektion schon in den späten 80er und frühen 90er Jahren des letzten Jahrhunderts weit verbreitet war. Aufgrund der geringen Anzahl der untersuchten Seren und der inhomogenen Zusammensetzung der Gruppen, lassen sich aus diesen Ergebnissen keine Seroprävalenzen der Taubenpopulationen bestimmen.

Betrachtet man die Ergebnisse anhand der Herkunft der Tauben, zeigt sich, dass anti-PiCV-Antikörper in allen Gruppen nachweisbar waren, wobei 77 % der Brieftauben (20 von 26), 80 % der Rassetauben (12 von 15) und 60 % der Stadtauben (15 von 25) positiv getestet wurden. Besonders hervorzuheben ist der hohe Anteil an PiCV-seropositiven Rassetauben, da PiCV bei Tauben dieser Nutzungsrichtung erst 1999 (Paré *et al.*) nachgewiesen wurde, und der PiCV-Nachweis bei Rassetauben im Vergleich zu Brieftauben selten ist. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die Problematik der PiCV-Infektion unter Rassetaubenzüchtern noch wenig bekannt ist und Rassetauben deshalb auch seltener auf PiCV untersucht werden (persönliche Mitteilung Dr. M. Neumann-Aukthun, Ense-Bremen).

Der Nachweis von anti-PiCV-Antikörpern in Stadtaubenseren ist der erste Beleg für eine PiCV-Infektion bei wildlebenden Tauben. Bei bisher untersuchten Stadt- oder Wildtauben gelang kein Nachweis von PiCV. Einschränkend dazu muss allerdings gesagt werden, dass nur eine Untersuchung von wildlebenden Tauben auf PiCV publiziert wurde (Hattermann *et al.*, 2002). Bei dieser Untersuchung wurden lediglich neun Stadt- und Wildtauben getestet. Außerdem wurde als Probenmaterial Blut eingesetzt, wodurch der negative Befund eine PiCV-Infektion der untersuchten Tiere nicht ausschließen kann. Aufgrund der Tatsachen, dass erstens von einer Empfänglichkeit von wildlebenden Tauben für eine PiCV-Infektion ausgegangen werden muss und es zweitens durch Freiflüge zum Kontakt von wildlebenden und privat gehaltenen Tauben kommt, ist es wahrscheinlich, dass auch wildlebende Tauben mit PiCV infiziert sind.

Fasst man die Ergebnisse aus den Untersuchungen von Patientenseren auf anti-PiCV-Antikörper zusammen, lassen sich folgende Schlüsse ziehen: (a) PiCV-Infektionen zirkulierten wahrscheinlich schon vor ihrer Erstbeschreibung durch Soike (1997) in Deutschland. (b) Es sind neben Brief- und Rassetauben auch Stadt- und Wildtauben von PiCV-Infektionen betroffen.

## **4.6 Ausblick**

Mit dem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten ELISA auf der Basis eines rekombinant erzeugten PiCV-Kapsidproteins gelang erstmals der Nachweis von anti-PiCV-Serum-Antikörpern. Zusätzlich zu den bisher etablierten Methoden zum direkten Erregernachweis steht somit ein Verfahren für serologische Untersuchungen von PiCV-Infektionen zur Verfügung. Die Möglichkeiten, die sich durch das Antigen und den Antikörpernachweis bieten, werden im Folgenden vorgestellt.

#### 4.6.1 Anti-PiCV-Antikörpernachweis

Der rCapPiCV-ELISA ist ein geeignetes Verfahren zum Nachweis spezifischer anti-PiCV-Serumantikörper. Es ist damit möglich, Informationen über Dauer und Stärke der humoralen Immunreaktion auf eine PiCV-Infektion zu gewinnen.

Im Hinblick auf die bisher unzureichend geklärte Pathogenese des PiCV sind besonders mögliche Korrelationen zwischen Manifestation der Erkrankung, Virusausscheidung, Viruspersistenz und Antikörpertiter von Interesse.

Für Infektionen mit dem nah verwandten BFDV wurden diese Zusammenhänge bereits näher untersucht: Papageien mit im Hämagglutinations-Test messbarer Virusausscheidung über den Federstaub waren im Hämagglutinations-Hemmungs-Test (HAH) anti-BFDV-Antikörper-negativ (Raidal & Cross, 1994; Khalesie *et al.*, 2005). Umgekehrt war bei allen seropositiven Tieren keine Virusausscheidung nachweisbar (Khalesie *et al.*, 2005). Eine negative Korrelation zwischen der Höhe des anti-BFDV-Antikörpertiters mittels HAH und der chronischen Verlaufsform einer BFDV-Infektion, der Schnabel- und Federkrankheit, konnten Ritchie *et al.* (1991) zeigen. Als mögliche Erklärung für diese Beobachtungen wird die virusinduzierte Schädigung des Immunsystems angenommen: Tiere mit effektiv arbeitendem Immunsystem sind in der Lage die Virusreplikation einzudämmen. Sie weisen also Antikörper auf, scheiden aber kein Virus aus. Durch Infektion kommt es zu einer massiven Schädigung der primär lymphatischen Organe und damit zum Zusammenbruch des Immunsystems. Die ungehinderte Vermehrung des BFDV führt dann zur Ausprägung der Schnabel- und Federkrankheit mit hohen Viruslasten im Federstaub. Daraus folgt, dass für die Beurteilung des BFDV-Status eines Vogels das klinische Bild, die Virusausscheidung und der serologische Befund herangezogen werden müssen (Khalesie *et al.*, 2005). Bei PCV-2-Infektionen von Schweinen hingegen lassen sich keine Korrelationen zwischen der anti-PCV-2-Antikörperantwort und der Ausprägung des PMWS nachweisen (Larochelle *et al.*, 2003; Sibila *et al.*, 2004).

Mit Hilfe des rCapPiCV-ELISAs kann untersucht werden, ob und welche Zusammenhänge für PiCV-Infektionen zwischen klinischer Erkrankung,

Antikörnernachweis und Virusausscheidung bestehen. Dafür sind virologische und serologische Untersuchungen von natürlich und experimentell infizierten Tauben notwendig.

Epidemiologisch sind persistent infizierte, symptomlose Alttauben von besonderer Bedeutung. Der Nachweis von anti-PiCV-Antikörpern in dem subklinisch infizierten Taubenbestand hat gezeigt, dass grundsätzlich eine Identifikation von infizierten Tauben über serologische Methoden möglich ist. Verlaufsuntersuchungen subklinisch infizierter Tauben und ihrer Nachzucht können klären, ob über den Antikörnernachweis zuverlässige Aussagen über den Infektionsstatus möglich sind. Außerdem kann so untersucht werden, ob und in welchem Maß es zum Transfer maternaler anti-PiCV-Antikörper auf die Küken kommt, und ob diese einen Einfluss auf die Virusreplikation haben.

Für die nah verwandten Viren BFDV, PCV-2 und CAV hat sich gezeigt, dass der Antikörnernachweis nicht zur Diagnostik der mit den Viren assoziierten Krankheiten PBFD, PMWS und CIA geeignet ist (Ritchie *et al.*, 1991; Larochelle *et al.*, 2003; Davidson *et al.*, 2004). Trotzdem wird der Antikörnernachweis eingesetzt und kann wertvolle Informationen liefern: Bei Papageien spricht der Nachweis von anti-BFDV-Antikörpern dafür, dass der Vogel dem Virus ausgesetzt war, er also potenziell infiziert ist (Ritchie *et al.*, 1991). Die Serologie liefert demnach zusätzlich Informationen, um – z. B. vor Integration in einen Bestand – potenzielle Virusausscheider zu identifizieren. Bei CAV und PCV-2 findet der Antikörnernachweis im Rahmen des Bestandsmanagements Verwendung. Über ihn lassen sich Aussagen über optimalen Impfzeitpunkt, Impferfolg und Infektionsstatus einer Herde treffen (Walker *et al.*, 2000; Schat, 2003; Sommer & Cardona 2003; Wang *et al.*, 2007; Opriessnig *et al.*, 2008; Patterson *et al.*, 2008). Eine besondere Rolle kommt der CAV-Serologie bei der Überwachung von spezifisch pathogenfreien (SPF) Hühnerbeständen zu. Das Virus persistiert in subklinisch infizierten Tieren in den Organen des Reproduktionstrakts und wird vertikal auf das Ei übertragen (Cardona *et al.*, 2000). Mit einem positiven anti-CAV-Antikörperbefund verliert die Herde ihren SPF-Status und ihre Eier dürfen in

Europa, Australien und den USA nicht mehr zur Produktion von humanen Impfstoffen eingesetzt werden (Schat, 2003).

Neben dem rein wissenschaftlichen Interesse sind entsprechende Untersuchungen für die PiCV-Infektion nötig, um die Interpretation eines serologischen PiCV-Befunds zu ermöglichen und effektive Bekämpfungsstrategien gegen PiCV und den mit ihm assoziierten Krankheitskomplex zu entwickeln. Vor seinem Einsatz in der Serodiagnostik steht aber noch die Validierung über eine weit größere Anzahl von Seren, als in dieser Studie untersucht wurden, aus.

#### **4.6.2 rCapPiCV**

Neben der Verwendung als Antigen zum Nachweis von anti-PiCV-Antikörpern, stellt rCapPiCV auch einen Impfstoffkandidaten dar. Bei PCV kodiert der ORF 2 für das einzige Strukturprotein, das Kapsidprotein (Nawagitgul *et al.*, 2000). In Schweinen wurden verschiedene PCV-2-Impfstoffkandidaten auf der Basis des Kapsidproteins von PCV-2 entwickelt und getestet. In unterschiedlichen Modellen konnte durch das Kapsidprotein eine Schutzwirkung gegen eine PCV-2-Infektion erzielt werden (Blanchard *et al.*, 2003; Fenaux *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007; Kixmüller, *et al.*, 2008; Fort *et al.*, 2008; Opriessnig *et al.*, 2008).

Die in Deutschland zugelassenen PCV-2 Impfstoffe basieren auf inaktiviertem Vollvirus (Circovac®, Merial) oder auf dem Kapsidprotein des PCV-2 (Ingelvac® CircoFLEX™, Boehringer Ingelheim Vetmedica). Analog dazu könnte die Impfung von Tauben mit dem Kapsidprotein von PiCV einen protektiven Effekt gegen eine PiCV-Infektion bewirken. Da hauptsächlich Jungtauben klinisch an einer PiCV-Infektion erkranken, wäre ein praxisrelevanter Ansatz, den Einfluss einer rCapPiCV-Impfung der Elterntiere auf eine PiCV-Belastungsinfektion der Nachzucht zu überprüfen.

Aufgrund der weiten Verbreitung und der hohen Tenazität des PiCV ist die Entwicklung einer Vakzine zum heutigen Zeitpunkt ein wichtiger Ansatz, um das Virus und die mit ihm assoziierten Krankheiten zu bekämpfen.

## 5 Zusammenfassung

Infektionen mit Pigeon-Circovirus gelten als Wegbereiter für ein verlustreiches und bei jungen Brieftauben weit verbreitetes multifaktorielles Krankheitsgeschehen, der Jungtaubenkrankheit. Neben der klinisch manifesten Form einer PiCV-Infektion kommt es auch zu subklinischen Infektionen, die am lebenden Tier durch die bislang entwickelten Nachweismethoden nicht sicher zu diagnostizieren sind.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein indirektes Virusnachweisverfahren entwickelt und zur Untersuchung von Taubenseren eingesetzt. Da PiCV nicht mit klassisch-kulturellen Verfahren vermehrt werden kann, wurde das Antigen für die Antikörperdetektion, basierend auf dem PiCV-Kapsidprotein, rekombinant in *E. coli* exprimiert. Um die Expression des Virusproteins im prokaryotischen System zu erleichtern, wurde die *cap*-Sequenz ohne die Arginin-Codon-reichen, 5'-terminalen 117 Nukleotide kloniert. Ein 5'-terminal eingefügter 6xHistidin-Tag ermöglichte die Aufreinigung mittels Metall-Affinitäts-Chromatographie und den Nachweis des rekombinanten Kapsidproteins rCapPiCV über anti-His-Antikörper. Durch Expression des Konstrukts und anschließende denaturierende Aufreinigung konnte rCapPiCV in großer Menge und hoher Reinheit gewonnen werden. Durch vergleichende Untersuchung der Reaktivität von rCapPiCV gegen Präimmun- und Immunseren von experimentell PiCV-infizierten Tauben und einem anti-His-Antikörper im Western Blot konnte die spezifische Bindung von anti-PiCV-Antikörpern durch das rekombinante Protein gezeigt werden. Damit gelang erstmals der Nachweis von anti-PiCV-Antikörpern.

Auf der Basis des rCapPiCV wurde ein indirekter ELISA entwickelt und zur Untersuchung von Taubenseren eingesetzt. Mit Hilfe des rCapPiCV-ELISAs konnte die Serokonversion experimentell PiCV-infizierter Tauben ein bis drei Wochen p. i. gezeigt werden. Die Untersuchung im Western Blot bestätigte bei allen Seren das Ergebnis der serologischen Untersuchung im ELISA und damit die Spezifität der Antigenpräparation. Der rCapPiCV-ELISA wurde daraufhin zur Untersuchung eines natürlich, subklinisch infizierten Taubenbestands eingesetzt und detektierte in 30 (81 %) von 37 getesteten Taubenseren anti-PiCV-Antikörper.



Dadurch wurde gezeigt, dass das entwickelte indirekte Virusnachweisverfahren geeignet ist, PiCV-Infektionsgeschehen auf Bestandsebene nachzuweisen. Aus dem Patientengut der Klinik für Vögel wurden Seren von Tauben mit unbekannten PiCV-Infektionsstatus aus den Jahren 1989, 1991 und 1994 ausgewählt und im rCapPiCV-ELISA getestet. Von 81 Seren waren 59 (73 %) PiCV-seropositiv, was darauf schließen lässt, dass PiCV schon vor seiner Erstbeschreibung 1997 in Deutschland in Taubenpopulationen zirkulierte.

Die vorgestellten serologischen Methoden können in weiterführenden Studien zu Epidemiologie, Pathogenese und Verlauf der PiCV-Infektion eingesetzt werden. Diese Daten aus der Forschung sind nötig, um die Bedeutung der PiCV-Serologie auf Bestands- und Einzeltierebene und ihren Nutzen für die klinische Diagnostik zu bewerten. Neben dem Einsatz zur Bindung virusspezifischer Antikörper, ist rCapPiCV eine potenzielle Subunit-Vakzine für die PiCV-Impfstoffentwicklung.

## 6 Summary

### **Development of serological detection methods for pigeon circovirus infection based on a recombinant capsid protein**

Infections with pigeon circovirus are involved in the development of young pigeon disease syndrome, a multifactorial disease with high morbidity and mortality rates widespread in young racing pigeons. In addition to the clinical manifestation of infection, PiCV causes subclinical infections for which no reliable *intra vitam* detection method is yet available.

In this study an indirect virus detection method was established and used to analyse pigeon sera. In the absence of a method to propagate PiCV *in vitro*, a recombinant antigen, basing on the PiCV capsid protein, was produced in *E. coli*. The viral *cap*-sequence was cloned without its 5'-terminal 117 nt because the high proportion of arginine codons in that region would be likely to prevent peptide expression. A sequence coding a 6xHistidin-Tag was inserted 5' of the coding sequence to allow purification by metal affinity chromatography and detection by anti-His-antibody. By expression of the construct and subsequent purification under denaturing conditions, highly purified recombinant protein was produced in large amounts. Comparative analysis of the reactivity of rCapPiCV against pre-immune, immune sera of experimentally PiCV-infected pigeons and anti-His-antibody demonstrated specific binding of anti-PiCV-antibody to the recombinant protein. Thereby anti-PiCV-antibodies became detectable for the first time.

An indirect ELISA based on rCapPiCV was developed and used to analyse pigeon sera. Testing of sera of experimentally infected pigeons demonstrated seroconversion one to three weeks p. i. Western Blot analysis confirmed the positivity of ELISA positive sera and hence the specificity of the antigen preparation. When used to test pigeon sera from a naturally infected, asymptomatic breeding flock, the rCapPiV-ELISA detected anti-PiCV-antibodies in 30 (81 %) of 37 samples. These results confirm that the indirect virus detection method established here is able to diagnose PiCV-infections at the flock level.

Diagnostic pigeon serum samples with unknown PiCV-status, collected in 1989, 1991 and 1994, were analysed using the rCapPiCV-ELISA. The detection of 59 (73 %) seropositives in 81 tested sera indicates that PiCV had circulated in pigeon populations prior to first detection of the virus in Germany in 1997.

The serological methods presented in this study can be usefully applied to further studies of the epidemiology, pathogenesis and course of PiCV-infection. Results from such studies are necessary to assess the relevance of PiCV-serology for individuals and flocks and should further determine the test's value in clinical diagnosis. In addition to its use to bind virus-specific antibodies, rCapPiCV also represents a potential subunit-vaccine.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abadie, J., Nguyen, F., Groizeleau, C., Amenna, N., Fernandez, B., Guereaud, C., Guigand, L., Robart, P., Lefebvre, B. & Wyers, M. (2001).** Pigeon circovirus infection: pathological observations and suggested pathogenesis. *Avian Pathology*, 30:149-158.
- Adair, B.M. (2000).** Immunopathogenesis of chicken anemia virus infection. *Developmental and Comparative Immunology*, 24:247-255.
- Allan, G.M., Phenix, K.V., Todd, D. & McNulty, M.S. (1994).** Some biological and physico-chemical properties of porcine circovirus. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B*, 41:17-26.
- Allan, G.M. & Ellis, J.A. (2000).** Porcine circoviruses: a review. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 12:3-14.
- Allan, G.M., McNeilly, E., Kennedy, S., Meehan, B., Moffett, D., Malone, F., Ellis, J. & Krakowka, S. (2000).** PCV-2-associated PDNS in Northern Ireland in 1990. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *The Veterinary Record*, 146:711-712.
- Bassami, M.R., Berryman, D., Wilcox, G.E. & Raidal, S.R. (1998).** Psittacine beak and feather disease virus nucleotide sequence analysis and its relationship to porcine circovirus, plant circoviruses, and chicken anaemia virus. *Virology*, 249:453-459.
- Blanchard, P., Mahe, D., Cariolet, R., Keranflec'h, A., Baudouard, M.A., Cordioli, P., Albina, E. & Jestin, A. (2003).** Protection of swine against post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) by porcine circovirus type 2 (PCV2) proteins. *Vaccine*, 21:4565-4575.
- von Bülow, V. & Schat, K.A. (1997).** Chicken infectious anemia. In *Diseases of Poultry* 10<sup>th</sup> Edition. Editors: Calnek, B.W., Barnes, H.J., Beard, C.W., McDougald, L.G. & Saif, Y.M.. Iowa State University Press. Ames, Iowa, USA. 739-756.
- Cardona, C.J., Oswald, W.B. & Schat, K.A. (2000).** Distribution of chicken anaemia virus in the reproductive tissues of specific-pathogen-free chickens. *Journal of General Virology*, 81:2067-2075.

- Chae, C. (2005).** A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. *The Veterinary Journal*, 169:326-336.
- Chandratilleke, D., O'Connell, P. & Schat, K.A. (1991).** Characterization of proteins of chicken infectious anemia virus with monoclonal antibodies. *Avian Diseases*, 35:854-862.
- Cheung, A.K. & Bolin, S.R. (2002).** Kinetics of porcine circovirus type 2 replication. *Archives of Virology*, 1:43 - 58.
- Claessens, J.A.; Schrier, C.C.; Mockett, A.P.; Jagt, E.H. & Sondermeijer, P.J. (1991).** Molecular cloning and sequence analysis of the genome of chicken anaemia agent. *Journal of General Virology*, 8:2003 - 2006.
- Coletti, M., Franciosini, M.P., Asdrubali, G. & Passamonti, F. (2000).** Atrophy of the primary lymphoid organs of meat pigeons in Italy associated with circoviruslike particles in the bursa of Fabricius. *Avian Diseases*, 44:454-459.
- Crowther, R.A.; Berriman, J.A.; Curran, W.L.; Allan, G.M. & Todd, D. (2003).** Comparison of the structures of three circoviruses: chicken anemia virus, porcine circovirus type 2, and beak and feather disease virus. *Journal of Virology*, 24:13036 - 13041.
- Davidson, I., Kedem, M., Borochovit, H., Kass, N., Ayali, G., Hamzani, E., Perelman, B., Smith, B. & Perk, S. (2004).** Chicken infectious anemia virus infection in Israeli commercial flocks: virus amplification, clinical signs, performance, and antibody status. *Avian Diseases*, 48(1):108-18.
- Duchatel, J.P., Todd, D., Curry, A., Smyth, J.A., Bustin, J.C. & Vindevogel, H. (2005).** New data on the transmission of pigeon circovirus. *The Veterinary Record*, 157:413-415.
- Duchatel, J.P., Todd, D., Smyth, J.A., Bustin, J.C. & Vindevogel, H. (2006).** Observations on detection, excretion and transmission of pigeon circovirus in adult, young and embryonic pigeons. *Avian Pathology*, 35:30-34.
- Eisenberg, S.W., van Asten, A.J., van Ederen, A.M. & Dorrestein, G.M. (2003).** Detection of circovirus with a polymerase chain reaction in the ostrich (*Struthio camelus*) on a farm in The Netherlands. *Veterinary Microbiology*, 95:27-38.

- Ellis, J.A., Hassard, L., Clarke, E.G., Harding, J., Allan, G., Willson, P., Strokappe, J., Martin, K., McNeilly, F., Meehan, B., Todd, D. & Haines, D. (1998).** Isolation of circovirus-like virus from lesions of pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome. *The Canadian Veterinary Journal*, 39:44–51.
- Farkas, T., Maeda, K., Sugiura, H., Kai, K., Hirai, K., Otsuki, K. & Hayashi, T. (1998).** A serological survey of chickens, Japanese quail, pigeons, ducks and crows for antibodies to chicken anaemia virus (CAV) in Japan. *Avian Pathology*, 27:316-320.
- Fenaux, M., Opriessnig, T., Halbur, P.G., Elvinger, F. & Meng, X.J. (2004).** A chimeric porcine circovirus (PCV) with the immunogenic capsid gene of the pathogenic PCV type 2 (PCV2) cloned into the genomic backbone of the nonpathogenic PCV1 induces protective immunity against PCV2 infection in pigs. *Journal of Virology*, 78:6297-6303.
- Finsterbusch, T., Steinfeldt, T., Caliskan, R. & Mankertz, A. (2005).** Analysis of the subcellular localization of the proteins Rep, Rep' and Cap of porcine circovirus type 1. *Virology*, 343:36-46.
- Fort, M., Sibila, M., Allepuz, A., Mateu, E., Roerink, F. & Segalés, J. (2008).** Porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination of conventional pigs prevents viremia against PCV2 isolates of different genotypes and geographic origins. *Vaccine*, 26:1063-1071.
- Franciosini, M.P., Fringuelli, E., Tarhuni, O., Guelfi, G., Todd, D., Casagrande, P.P., Falocci, N. & Asdrubali, G. (2005).** Development of a polymerase chain reaction-based in vivo method in the diagnosis of subclinical pigeon circovirus infection. *Avian Diseases*, 49:340-343.
- Freick, M., (2006).** Eine virologische Studie zur Ätiologie der Jungtaubenkrankheit (Young Pigeon Disease Syndrome), Dissertation. Institut für Virologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig.
- Freick, M., Müller, H. & Raue, R. (2008).** Rapid detection of pigeon herpesvirus, fowl adenovirus and pigeon circovirus in young racing pigeons by multiplex PCR. *Journal of Virological Methods*, 148:226-231.
- Georgiou, G. & Valax, P. (1996).** Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 7:190-197.

- Gerdes, G.H. (1993).** Two very small viruses – a presumptive identification. *Journal of the South African Veterinary Association* 64:2.
- Goldsmith, T. L. (1995).** Documentation of passerine circoviral infection [abstract]. In *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians*, August, Philadelphia, PA, USA, 349-350.
- Grund, C., Gerbermann, H. & Grimm, F. (2001).** Prevalence of subclinical paramyxovirus infections in parrots in Germany: investigations of droppings and sera [abstract]. In *Proceedings of the 6th European Association of Avian Veterinarians Conference*, München, Deutschland, 208-211.
- Grund, S. (2002).** Jungtauben-Krankheit – Winterruhe?. *Die Brieftaube*, 43:1555.
- Halami, M.Y., Nieper, H., Müller, H. & Johne, R. (2008).** Detection of a novel circovirus in mute swans (*Cygnus olor*) by using nested broad-spectrum PCR. *Virus Research*, 132:208-212.
- Hamel, A.L., Lin, L.L. & Nayar, G.P. (1998).** Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *Journal of Virology*, 72:5262-5267.
- Hattermann, K., Soike, D., Grund, C. & Mankertz, A. (2002).** A method to diagnose Pigeon circovirus infection in vivo. *Journal of Virological Methods*, 104:55-58.
- Hattermann, K., Schmitt, C., Soike, D. & Mankertz, A. (2003).** Cloning and sequencing of Duck circovirus (DuCV). *Archives of Virology*, 148:2471-2480.
- Heath, L., Williamson, A.L. & Rybicki, E.P. (2006).** The capsid protein of beak and feather disease virus binds to the viral DNA and is responsible for transporting the replication-associated protein into the nucleus. *Journal of Virology*, 80:7219-7225.
- Hoop, R.K. (1992).** Persistence and vertical transmission of chicken anaemia agent in experimentally infected laying hens. *Avian Pathology*, 21:493-501.

- Hughes, A.L. & Piontkivska, H. (2008).** Nucleotide sequence polymorphism in circoviruses. *Infection, Genetics and Evolution*, 8:130-138.
- Johne, R., Raue, R., Grund, C., Kaleta, E.F. & Müller, H. (2004).** Recombinant expression of a truncated capsid protein of beak and feather disease virus and its application in serological tests. *Avian Pathology*, 33:328-336.
- Johne, R., Fernandez-de-Luco, D., Hofle, U. & Müller, H. (2006).** Genome of a novel circovirus of starlings, amplified by multiply primed rolling-circle amplification. *Journal of General Virology*, 87:1189-1195.
- Kamada, K.; Kuroishi, A.; Kamahora, T.; Kabat, P.; Yamaguchi, S. & Hino, S. (2006).** Spliced mRNAs detected during the life cycle of Chicken anemia virus. *Journal of General Virology*, 8:2227 – 2233.
- Kamphausen, L (2002).** Die Jungtauben-Krankheit – eine andere Betrachtungsweise. *Die Brieftaube*, 36: 1318-1319.
- Khalesi, B., Bonne, N., Stewart, M., Sharp, M. & Raidal, S. (2005).** A comparison of haemagglutination, haemagglutination inhibition and PCR for the detection of psittacine beak and feather disease virus infection and a comparison of isolates obtained from lorids. *Journal of General Virology*, 86:3039-3046.
- Kim, J., Chung, H.K. & Chae, C. (2003).** Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. *The Veterinary Journal*, 166:251-256.
- Kixmüller, M., Ritzmann, M., Eddicks, M., Saalmüller, A., Elbers, K. & Fachinger, V. (2008).** Reduction of PMWS-associated clinical signs and co-infections by vaccination against PCV2. *Vaccine*, 26:3443-3451.
- Korbel, R., Reese, S. & König, H.E. (2009).** Klinischer Untersuchungsgang. In *Anatomie der Vögel*. Editors: König, H.E., Korbel, R. & Liebich, H.-G.. Schattauer GmbH. Stuttgart, Deutschland. 277-284.
- Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685.



- Larochele, R., Magar, R. & D'Allaire, S. (2003).** Comparative serologic and virologic study of commercial swine herds with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 67:114.
- Latimer, K.S., Rakich, P.M., Kircher, I.M., Ritchie, B.W., Niagro, F.D., rd, W.L. & Lukert, P.D. (1990).** Extracutaneous viral inclusions in psittacine beak and feather disease. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2:204-207.
- Latimer, K.S., Rakich, P.M., Niagro, F.D., Ritchie, B.W., Steffens, W.L., Campagnoli, R.P., Pesti, D.A. & Lukert, P.D. (1991).** An updated review of psittacine beak and feather disease. *Journal of the Association of Avian Veterinarians*, 5:211-220.
- Liu, Q., Tikoo, S.K. & Babiuk, L.A. (2001).** Nuclear Localization of the ORF2 Protein Encoded by Porcine Circovirus Type 2. *Virology*, 285:91-99.
- Liu, J.; Chen, I. & Kwang, J. (2005).** Characterization of a previously unidentified viral protein in porcine circovirus type 2-infected cells and its role in virus-induced apoptosis. *Journal of Virology*, 13:8262 – 8274.
- Mankertz, A., Persson, F., Mankertz, J., Blaess, G. & Buhk, H.J. (1997).** Mapping and characterization of the origin of DNA replication of porcine circovirus. *Journal of Virology*, 71:2562-2566.
- Mankertz, A., Hattermann, K., Ehlers, B. & Soike, D. (2000).** Cloning and sequencing of columbid circovirus (CoCV), a new circovirus from pigeons. *Archives of Virology*, 145:2469-2479.
- Mankertz, A. & Hillenbrand, B. (2001).** Replication of porcine circovirus type 1 requires two proteins encoded by the viral rep gene. *Virology*, 279(2):429-38.
- Mankertz, A. (2008).** Molecular Biology of Porcine Circoviruses. In *Animal Viruses: Molecular Biology*. Editors: Mettenleiter, T.C. & Sobrino, F. Caister Academic Press. Norfolk, UK. 355-374.
- McNulty, M.S. (1991).** Chicken anaemia agent: A review. *Avian Pathology*, 20:187-203.

- McNulty, M.S., McIlroy, S.G., Bruce, D.W. & Todd, D. (1991).** Economic effects of subclinical chicken anemia agent infection in broiler chickens. *Avian Diseases*, 35:263-268.
- McNulty, M., Dale, J., Lukert, P., Mankertz, A., Randles, J. & Todd, D. (2000).** *Circoviridae*. In Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Editors: van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R. & Wickner, R. B. Academic Press, San Diego, USA:299-303.
- Meehan, B.M., Todd, D., Creelan, J.L., Earle, J.A., Hoey, E.M. & McNulty, M.S. (1992).** Characterization of viral DNAs from cells infected with chicken anaemia agent: sequence analysis of the cloned replicative form and transfection capabilities of cloned genome fragments. *Archives of Virology*, 124:301-319.
- Meehan, B.M., McNeilly, F., McNair, I., Walker, I., Ellis, J.A., Krakowka, S. & Allan, G.M. (2001).** Isolation and characterization of porcine circovirus 2 from cases of sow abortion and porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Archives of Virology*, 146:835-842.
- Messana, M., Kösters, J. & Grund, C. (1997).** Studies on reactivation and transmission of pigeon herpes virus (PHV) for raising PHV-free pigeons (*Columba livia dom.*). *Avian Pathology*, 26:859-864.
- Murphy, F.A., Gibbs, E.P.J., Horzinek, M.C. & Studdert, M.J. (1999).** *Circoviridae*. In *Veterinary Virology* 3<sup>rd</sup> Edition. Academic Press. San Diego, USA. 357-361.
- Mysore, J., Read, D. & Daft, B. (1995).** Circovirus-like particles in finches [abstract]. In Proceedings of the Annual Meeting of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Histopathology Section. Reno, NV, USA, 2.
- Nawagitgul, P.; Morozov, I.; Bolin, S.R.; Harms, P.A.; Sorden, S.D. & Paul, P. S. (2000).** Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *Journal of General Virology*, 9:2281 - 2287.

- Nawagitgul, P., Harms, P.A., Morozov, I., Thacker, B.J., Sorden, S.D., Lekcharoensuk, C. & Paul, P.S. (2002).** Modified indirect porcine circovirus (PCV) type 2-based and recombinant capsid protein (ORF2)-based enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to PCV. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 9:33-40.
- Noteborn, M.H., de Boer, G.F., Van Roozelaar, D.J., Karreman, C., Kranenburg, O., Vos, J.G., Jeurissen, S.H., Hoebe, R.C., Zantema, A., Koch, G., von Ormondt, H. & van der Eb, A.J. (1991).** Characterization of cloned chicken anemia virus DNA that contains all elements for the infectious replication cycle. *Journal of Virology*, 65:3131-3139.
- Noteborn, M.H., Kranenburg, O., Zantema, A., Koch, G., de Boer, G.F. & van der Eb, A.J. (1992).** Transcription of the chicken anemia virus (CAV) genome and synthesis of its 52-kDa protein. *Gene*, 118:267-271.
- Otaki, Y., Saito, K., Tajima, M. & Nomura, Y. (1992).** Persistence of maternal antibody to chicken anaemia agent and its effect on the susceptibility of young chickens. *Avian Pathology*, 21:147-151.
- Opriessnig, T., Meng, X.J. & Halbur, P.G. (2007).** Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 19:591-615.
- Opriessnig, T., Patterson, A.R., Elsener, J., Meng, X.J. & Halbur, P.G. (2008).** Influence of maternal antibodies on efficacy of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination to protect pigs from experimental infection with PCV2. *Clinical and Vaccine Immunology*, 15:397-401.
- Paré, J.A., Brash, M.L., Hunter, D.B. & Hampson, R.J. (1999).** Observations on pigeon circovirus infection in Ontario. *The Canadian Veterinary Journal*, 40:659-662.
- Pass, D.A., Plant, S.L. & Sexton, N. (1994).** Natural infection of wild doves (*Streptopelia senegalensis*) with the virus of psittacine beak and feather disease. *Australian Veterinary Journal*, 71:307-308.
- Pass, D.A., Perry, R.A. (1984).** The pathology of psittacine beak and feather disease. *Australian Veterinary Journal*, 61(3):69-74.

- Patterson, A.R., Johnson, J., Ramamoorthy, S., Meng, X.J., Halbur, P.G. & Opriessnig, T. (2008).** Comparison of three enzyme-linked immunosorbent assays to detect porcine circovirus-2 (PCV-2)-specific antibodies after vaccination or inoculation of pigs with distinct PCV-1 or PCV-2 isolates. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20:744-751.
- Phenix, K.V., Weston, J.H., Ypelaar, I., Lavazza, A., Smyth, J.A., Todd, D., Wilcox, G.E. & Raidal, S.R. (2001).** Nucleotide sequence analysis of a novel circovirus of canaries and its relationship to other members of the genus *Circovirus* of the family *Circoviridae*. *Journal of General Virology*, 82:2805-2809.
- Pringle, C.R. (1999).** Virus taxonomy at the XIth International Congress of Virology, Sydney, Australia, (1999). *Archives of Virology*, 144:2065-2070.
- Raidal, S.R. & Cross, G. (1994).** The haemagglutination spectrum of psittacine beak and feather disease virus. *Avian Pathology*, 23:621-630.
- Raidal, S.R. & Riddoch, P.A. (1997).** A feather disease in Senegal doves (*Streptopelia senegalensis*) morphologically similar to psittacine beak and feather disease. *Avian Pathology*, 26:829-836.
- Raue, R., Schmidt, V., Freick, M., Reinhardt, B., Johne, R., Kamphausen, L., Kaleta, E.F., Müller, H. & Krautwald-Junghanns, M.E. (2005).** A disease complex associated with pigeon circovirus infection, young pigeon disease syndrome. *Avian Pathology*, 34:418-425.
- Reiner, G. & Willems, H. (2008).** Porcine Circovirus 2 (PCV 2) - Zusammenhänge zwischen Sequenz, Funktion und Virulenz. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 115:449-456.
- Reitz, N., Kamphausen, L., Krautwald-Junghanns, M.E. & Schmidt, V. (2003).** Fragebogenaktion Jungtauben-Krankheit. *Die Brieftaube*, 35:1291-1294.
- Riddoch, P.A., Raidal, S.R. & Cross, G.M. (1996).** Psittacine circovirus antibody detection and an update on the methods for diagnosis of psittacine beak and feather disease. *Australian Veterinary Practitioner*, 26:134-139.
- Ritchie, B.W., Niagro, F.D., Lukert, P.D., Steffens, W.L., III & Latimer, K.S. (1989).** Characterization of a new virus from cockatoos with psittacine beak and feather disease. *Virology*, 171:83-88.

- Ritchie, B.W., Niagro, F.D., Latimer, K.S., Lukert, P.D., Steffens, W.L., III, Rakich, P.M. & Prichard, N. (1990).** Ultrastructural, protein composition, and antigenic comparison of psittacine beak and feather disease virus purified from four genera of psittacine birds. *Journal of Wildlife Diseases*, 26(2):196-203.
- Ritchie, B.W., Niagro, F.D., Latimer, K.S., Steffens, W.L., III, Pesti, D. & Lukert, P.D. (1991).** Hemagglutination by psittacine beak and feather disease virus and use of hemagglutination inhibition for detection of antibodies against the virus. *American Journal of Veterinary Research*, 52:1810-1815.
- Rosell, C., Segalés, J., Ramos-Vara, J.A., Folch, J.M., Rodríguez-Arriola, G.M., Duran, C.O., Balasch, M., Plana-Duran, J. & Domingo, M. (2000).** Identification of porcine circovirus in tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *The Veterinary Record*, 146:40-43.
- Rosenberger, J.K. & Cloud, S.S. (1989).** The effects of age, route of exposure, and coinfection with infectious bursal disease virus on the pathogenicity and transmissibility of chicken anemia agent (CAA). *Avian Diseases*, 33:753-759.
- Roy, P., Dhillon, A.S., Lauerman, L. & Shivaprasad, H.L. (2003).** Detection of pigeon circovirus by polymerase chain reaction. *Avian Diseases*, 47:218-222.
- Schat, K.A. (2003).** Circovirus Infections. In *Diseases of Poultry* 11<sup>th</sup> Edition. Editors: Y.M.Saif, Barnes, H.J., Fadly, A.M., Glisson, J.R., McDougald, L.G. & Swayne, D.E.. Iowa State University Press. Ames, Iowa, 181-212.
- Schmidt, V., (2007).** Untersuchungen zur Ätiologie der „Jungtauben-Krankheit“ (Young Pigeon Disease syndrome) der Brieftaube, Dissertation. Klinik für Vögel und Reptilien der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig.
- Schmidt, V., Schlömer, J., Luken, C., Johne, R., Biere, B., Müller, H. & Krautwald-Junghanns, M.E. (2008).** Experimental infection of domestic pigeons with pigeon circovirus. *Avian Diseases*, 52:380-386.

- Scott, A.N.J., Beckett, A., Smyth, J.A., Ball, N.W., Palya, V. & Todd, D. (2006).** Serological diagnosis of goose circovirus infections. *Avian Pathology*, 35:495-499.
- Scullion, F.T. & Scullion, M.G. (2007).** Pathologic findings in racing pigeons (*Columba livia domestica*) with "young bird sickness". *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 21:1-7.
- Shivaprasad, H.L., Chin, R.P., Jeffrey, J.S., Nordhausen, R.W. & Latimer, K.S. (1993).** A new viral disease of pigeons? Particles resembling circovirus in the bursa of fabricius [abstract]. In *Proceedings of the 42<sup>nd</sup> Western Poultry Disease Conference*. Sacramento, USA, 99-100.
- Shivaprasad, H.L., Chin, R.P., Jeffrey, J.S., Latimer, K.S., Nordhausen, R.W., Niagro, F.D. & Campagnoli, R.P. (1994).** Particles resembling circovirus in the bursa of Fabricius of pigeons. *Avian Diseases*, 38:635-641.
- Shivaprasad, H.L., Hill, D., Todd, D. & Smyth, J.A. (2004).** Circovirus infection in a Gouldian finch (*Chloebea gouldiae*). *Avian Pathology*, 33:525-529.
- Sibila, M., Calsamiglia, M., Segalés, J., Blanchard, P., Badiella, L., Le Dimna, M., Jestin, A. & Domingo, M. (2004).** Use of a polymerase chain reaction assay and an ELISA to monitor porcine circovirus type 2 infection in pigs from farms with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *American Journal of Veterinary Research*, 65:88-92.
- Smyth, J.A. & Carroll, B.P. (1995).** Circovirus infection in European racing pigeons. *The Veterinary Record*, 136:173-174.
- Smyth, J.A., Weston, J., Moffett, D.A. & Todd, D. (2001).** Detection of circovirus infection in pigeons by *in situ hybridization* using cloned DNA probes. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 13:475-482.
- Smyth, J.A., Todd, D., Scott, A., Beckett, A., Twentyman, C.M., Brojer, C., Uhlhorn, H. & Gavier-Widen, D. (2006).** Identification of circovirus infection in three species of gull. *The Veterinary Record*, 159:212-214.
- Soike, D. (1997).** Circovirusinfektion bei Tauben. *Tierärztliche Praxis*, 25:52-54.
- Soike, D., Kohler, B. & Albrecht, K. (1999).** A circovirus-like infection in geese related to a runting syndrome. *Avian Pathology*, 28:199-202.

- Soike, D., Hattermann, K., Albrecht, K., Segalés, J., Domingo, M., Schmitt, C. & Mankertz, A. (2001).** A diagnostic study on columbid circovirus infection. *Avian Pathology*, 30:605-611.
- Soike, D., Albrecht, K., Hattermann, K., Schmitt, C. & Mankertz, A. (2004).** Novel circovirus in mulard ducks with developmental and feathering disorders. *The Veterinary Record*, 154:792-793.
- Sommer, F. & Cardona, C. (2003).** Chicken anemia virus in broilers: dynamics of the infection in two commercial broiler flocks. *Avian Diseases*, 47:1466-1473.
- Stewart, M.E., Perry, R. & Raidal, S.R. (2006).** Identification of a novel circovirus in Australian ravens (*Corvus coronoides*) with feather disease. *Avian Pathology*, 35:86-92.
- Stoiber, F. (2003).** Jungtauben-Krankheit. *Die Brieftaube*, 1:39.
- Taras, L., Kubicek, O., Juranova, R. & Jurajda, V. (2003).** The first demonstration of pigeon circovirus infection in the Czech Republic based on histology and nested PCR. *Acta Veterinaria Brno*, 72:577-582.
- Tavernier, P.; De Herdt, P.; Thoonen, H. & Ducatelle, R. (2000).** Epidemiology and significance of circovirus-like infections in racing pigeons (*Columba livia*). Tagungsband der XII. DVG-Tagung über Vogelkrankheiten. München, Deutschland, 153-155.
- Tischer, I., Rasch, R. & Tochtermann, G. (1974).** Characterization of papovavirus- and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Erste Abteilung Originale. Reihe A: Medizinische Mikrobiologie und Parasitologie*, 26:153–167.
- Tischer, I., Gelderblom, H., Vettermann, W. & Koch, M.A. (1982).** A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature*, 295:64-66.
- Todd, D., Niagro, F.D., Ritchie, B.W., Curran, W., Allan, G.M., Lukert, P.D., Latimer, K.S., Steffens, W.L., III, & McNulty, M.S. (1991).** Comparison of three animal viruses with circular single-stranded DNA genomes. *Archives of Virology*, 117:129-135.

- Todd, D. (2000).** Circoviruses: immunosuppressive threats to avian species: a review. *Avian Pathology*, 29:373-394.
- Todd, D., Weston, J.H., Soike, D. & Smyth, J.A. (2001a).** Genome sequence determinations and analyses of novel circoviruses from goose and pigeon. *Virology*, 286:354-362.
- Todd, D., Weston, J., Ball, N.W., Borghmans, B.J., Smyth, J.A., Gelmini, L. & Lavazza, A. (2001b).** Nucleotide sequence-based identification of a novel circovirus of canaries. *Avian Pathology*, 30:321-325.
- Todd, D., Duchatel, J.P., Weston, J.H., Ball, N.W., Borghmans, B.J., Moffett, D.A. & Smyth, J.A. (2002).** Evaluation of polymerase chain reaction and dot blot hybridisation tests in the diagnosis of pigeon circovirus infections. *Veterinary Microbiology*, 89:1-16.
- Todd, D. (2004).** Avian circovirus diseases: lessons for the study of PMWS. *Veterinary Microbiology*, 98:169-174.
- Todd, D., Bendinelli, M., Biagini, P., Hino, S., Mankertz, A., Mishiro, S., Niel, C., Okamoto, H., Raidal, S., Ritchie, B.W. & Teo, G.C. (2005).** Family *Circoviridae*. In *Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses*, Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. Editors: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U. & Ball, L.A. Elsevier Academic Press. San Diego, USA, London UK, 327-334.
- Todd, D., Duchatel, J.P., Bustin, J.C., Scullion, F.T., Scullion, M.G., Scott, A.N., Curry, A., Ball, N.W. & Smyth, J.A. (2006).** Detection of pigeon circovirus in cloacal swabs: implications for diagnosis, epidemiology and control. *The Veterinary Record*, 159:314-317.
- Todd, D., Scott, A.N., Fringuelli, E., Shivraprasad, H.L., Gavier-Widen, D. & Smyth, J.A. (2007).** Molecular characterization of novel circoviruses from finch and gull. *Avian Pathology*, 36:75-81.
- Todd, D., Fringuelli, E., Scott, A.N., Borghmans, B.J., Duchatel, J.P., Shivraprasad, H.L., Raidal, S.R., Abadie, J.X., Franciosini, M.P. & Smyth, J.A. (2008).** Sequence comparison of pigeon circoviruses. *Research in Veterinary Science*, 84:311-319.



- Tomás, A., Fernandes, L.T., Valero, O. & Segalés, J. (2008).** A meta-analysis on experimental infections with porcine circovirus type 2 (PCV2). *Veterinary Microbiology*, 132:260-273.
- Toro, H., Ramirez, A.M. & Larenas, J. (1997).** Pathogenicity of chicken anaemia virus (isolate 10343) for young and older chickens. *Avian Pathology*, 26:485-499.
- Toro, H., van Santen, V.L., Li, L., Lockaby, S.B., van Santen, E. & Hoerr, F.J. (2006).** Epidemiological and experimental evidence for immunodeficiency affecting avian infectious bronchitis. *Avian Pathology*, 35:455-464.
- Trundova, M. & Celer, V. (2007).** Expression of porcine circovirus 2 ORF2 gene requires codon optimized *E. coli* cells. *Virus Genes*, 34(2):199-204.
- Twentyman, C.M., Alley, M.R., Meers, J., Cooke, M.M. & Duignan, P.J. (1999).** Circovirus-like infection in a southern black-backed gull (*Larus dominicanus*). *Avian Pathology*, 28:513-516.
- Walker, C. (2002).** Die Jungtauben-Krankheit auch in Australien. *Die Brieftaube*, 34:1254.
- Walker, I.W., Konoby, C.A., Jewhurst, V.A., McNair, I., McNeilly, F., Meehan, B.M., Cottrell, T.S., Ellis, J.A. & Allan, G.M. (2000).** Development and application of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of serum antibodies to porcine circovirus type 2. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 12:400-405.
- Wang, X., Jiang, P., Li, Y., Jiang, W. & Dong, X. (2007).** Protection of pigs against post-weaning multisystemic wasting syndrome by a recombinant adenovirus expressing the capsid protein of porcine circovirus type 2. *Veterinary Microbiology*, 121:215-224.
- Warzecha, M. (2002).** Jungtauben-Krankheit / CD-Syndrom. *Die Brieftaube*, 33:1221-1222 und 1227-1228.
- Welch, J., Bienek, C., Gomperts, E. & Simmonds, P. (2006).** Resistance of porcine circovirus and chicken anemia virus to virus inactivation procedures used for blood products. *Transfusion*, 46:1951-1958.

**Woods, L.W., Latimer, K.S., Barr, B.C., Niagro, F.D., Campagnoli, R.P., Nordhausen, R.W. & Castro, A.E. (1993).** Circovirus-like infection in a pigeon. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 5 :609-612.

**Woods, L.W., Latimer, K.S., Niagro, F.D., Riddell, C., Crowley, A.M. Anderson, M.L., Daft, B.M., Moore, J.D., Campagnoli, R.P. & Nordhausen, R.W. (1994).** A retrospective study of circovirus infection in pigeons: nine cases (1986-(1993)). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 6:156-164.

**Woods, L.W. & Shivaprasad, H.L. (1997).** Pigeon circovirus infection. In *Diseases of Poultry 10<sup>th</sup> Edition*. Editors: Calnek, B.W., Barnes, H.J., Beard, C.W., McDougald, L.G. & Saif, Y.M.. Iowa State University Press. Ames, Iowa, USA. 1050-1053.

**Yuasa, N., Taniguchi, T. & Yoshida, I. (1979).** Isolation and Some Characteristics of an Agent Inducing Anemia in Chicks. *Avian Diseases*, 23:366-385.

**Zumbusch, H.J. (2002).** Ein ganzheitlicher Ansatz zur Vorbeuge der Jungtaubenkrankheit. *Die Brieftaube*, 37:1356-1357.

## 8 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Rüdiger Korbelt für die Überlassung des Arbeitsplatzes und die sehr gute Zusammenarbeit während und nach meiner Zeit an der Klinik für Vögel.

Bei Herrn Priv.-Doz. Christian Grund möchte ich mich für die Überlassung des Themas, für die fachliche und menschliche Unterstützung und besonders für seine Begeisterungsfähigkeit bedanken.

Die Konstruktion des Vektors und erste Probeexpressionen wurden im Fachbereich FG12 Virale Infektionen am Robert-Koch-Institut in Berlin durchgeführt. Priv.-Doz. Annette Mankertz und Dr. Tim Finsterbusch danke ich für die gute Zusammenarbeit und die herzliche Aufnahme in ihrem Labor.

Prof. Thomas Göbel, Dr. Stefan Härtle und Ramona Schmitt aus dem Lehrstuhl für Physiologie der Tierärztlichen Fakultät der LMU München danke ich für Rat, Tat, Hilfe und Arbeitsplatz für die Optimierung der Expressionsbedingungen.

Bei allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Klinik für Vögel möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bedanken. Mein besonderer Dank gilt Dana Härtner, Kathrin Schmidbauer, Dr. Ulrich Mohn und Dr. Beate Köhler aus der Abteilung Virologie für ihre bemerkenswerte Hilfsbereitschaft. Aus der Abteilung Ziervogelklinik gilt mein besonderer Dank Dr. Heike Reball, Martina Rzepka und Susanne Schlemmer.

Ich danke meiner Familie für ihre Unterstützung, ganz besonders meiner Schwester Susanna Berner für ihren Überblick über mögliche bzw. empfohlene Schreibweisen nach der neuen Rechtschreibreform. Von ganzem Herzen danke ich Maik Koltermann.

Meinen Eltern kann ich nicht genug danken für das Ermöglichen eines sorgenfreien Lebensweges und ihren Rückhalt in allen Lebenslagen. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.